

**KAI STEINFELD**

---

ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Mäuse  
zeigen Veränderungen der testikulären  
Makro- und Mikrozirkulation und der Hormonwerte



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

**Aus dem Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**  
Betreuer: Prof. Dr. Martin Bergmann

und

**der Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und  
Andrologie der Justus-Liebig-Universität Gießen**  
Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang Weidner

# **ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout- Mäuse zeigen Veränderungen der testikulären Makro- und Mikrozirkulation und der Hormonwerte**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Kai Steinfeld**

Tierärztin aus Lich

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Martin Bergmann

Prof. Dr. Wolfgang Weidner

Tag der Disputation:

16.09.2015



**Diese Studie wurde finanziell gefördert von der Deutschen  
Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen der Klinischen Forschergruppe  
KFO 181/2 Mechanism of male factor infertility**

(Projekt 8: "Atherosclerosis-related disturbances of spermatogenesis: lessons from  
the ApoE<sup>-/-</sup>/LDL receptor<sup>-/-</sup> double knockout mouse model and prospective  
investigations in men", *Weidner, Linn, Middendorff*)

*Meinem Vater*

---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Anatomie und Physiologie des Hodens</b>	<b>1</b>
1.1.1	Allgemeines	1
1.1.2	Anatomischer Aufbau des Hodens	2
1.1.3	Lage der Hoden im Körper der Maus	5
1.1.4	Hodentubuli und Spermatogenese	8
1.1.4.1	Die verschiedenen Spermatogenesestadien und ihre Differenzierung	10
1.1.4.2	Sertolizellen	11
1.1.4.3	Leydig-Zwischenzellen	11
1.1.5	Gefäßversorgung des Hodens	14
<b>1.2</b>	<b>Altern und Hoden</b>	<b>26</b>
<b>1.3</b>	<b>Arteriosklerose</b>	<b>27</b>
1.3.1	Entstehungsmechanismen	27
1.3.1.1	Monozyten / Makrophagen	28
1.3.1.2	Endotheliale Dysfunktion	30
1.3.1.3	Ausbildung von Fettstreifen	30
1.3.1.4	Fortschreiten der Läsionen	31
1.3.1.5	Fibröse Plaques und Plaques-Ruptur	31
1.3.2	Veränderungen in kapillaren Gefäßen bei Mikrozirkulationsstörungen	33
<b>1.4</b>	<b>Arteriosklerose und Spermatogenese – das Mausmodell</b>	<b>34</b>
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG und ZIEL DER ARBEIT</b>	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>VERSUCHSAUFBAU</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Material</b>	<b>39</b>
4.1.1	Versuchstiere	39
4.1.2	Untersuchungsmaterial	39

4.1.3	Chemikalien und Verbrauchsstoffe.....	39
4.1.3.1	Für die Mausperfusion.....	39
4.1.3.2	Für die Hodeneinbettung.....	40
4.1.3.3	Für die Herstellung der Semidünnschnitte.....	40
4.1.3.4	Für die Steroidmessung.....	40
4.1.4	Geräte.....	41
4.1.4.1	Für die Präparation und Perfusion des Tierkörpers.....	41
4.1.4.2	Für die MikroCT-Untersuchung der kontrastierten Hoden.....	41
4.1.4.3	Für die Hoden-Einbettung.....	42
4.1.4.4	Für die Herstellung der Semidünnschnitte.....	42
4.1.4.5	Für die Auszählung der Kapillaren im Hoden.....	42
4.1.4.6	Für die Steroidmessung.....	42
4.1.5	Computer-Software.....	43
4.1.5.1	Für die Auswertung der MikroCT-Aufnahmen.....	43
4.1.5.2	Für die Auswertung der Semidünnschnitte.....	43
4.1.5.3	Für die Auswertung der Wurfgrößen.....	43
4.1.5.4	Für die statistischen Analysen.....	43
4.1.6	Sonstiges.....	44
4.1.6.1	Herstellung des Fixierungsgemisches mit Hepes-Puffer.....	44
4.1.6.2	Hepes-Puffer-Stammlösung.....	44
4.1.6.3	Agar 100 – Ansatz (Agar 100 Resin Kit).....	44
<b>4.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>46</b>
4.2.1	Das Tiermodell.....	46
4.2.2	Präparation und Probenentnahme.....	47
4.2.2.1	Das Kontrastmittel.....	48
4.2.3	Mikro-Computer-Tomographie-Untersuchung des Hodens.....	51
4.2.3.1	Quantitative Analyse des Hodens.....	53

4.2.4	Herstellung histologischer Präparate .....	55
4.2.4.1	Epon-Einbettung des Hodens .....	55
4.2.4.2	Herstellung der Gewebe-Semidünnschnitte .....	57
4.2.5	Bestimmung der Kapillarparameter .....	58
4.2.5.1	Bestimmung der kapillaren Längendichte .....	61
4.2.5.2	Bestimmung der kapillaren Volumendichte .....	63
4.2.5.3	Bestimmung der kapillaren Oberflächendichte .....	65
4.2.6	Berechnung von Kapillarlänge, -volumen und -oberfläche .....	67
4.2.6.1	Berechnung der Kapillarlänge .....	67
4.2.6.2	Berechnung des Kapillarvolumens .....	67
4.2.6.3	Berechnung der Kapillaroberfläche .....	67
4.2.7	Hormonmessung / Steroidbestimmung .....	68
4.2.8	Auswertung der Wurfgrößen .....	68
4.2.9	Statistische Analyse .....	69
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>70</b>
<b>5.1</b>	<b>Ergebnisse der Steroidmessung .....</b>	<b>70</b>
5.1.1	Testosteron, AD und Corticosteron – alle Altersgruppen zusammen .....	70
5.1.2	Testosteron, AD und Corticosteron – Aufteilung in einzelne Altersgruppen .....	72
<b>5.2</b>	<b>Ergebnisse der MikroCT-Untersuchungen .....</b>	<b>76</b>
5.2.1	Hodenvolumen (Testis volume) .....	77
5.2.2	Gefäßvolumen (Vessel volume) .....	79
<b>5.3</b>	<b>Ergebnisse der stereologischen Untersuchungen .....</b>	<b>81</b>
5.3.1	Absolute Kapillarparameter .....	82
5.3.1.1	Absolute Kapillarlänge .....	82
5.3.1.2	Absolutes Kapillarvolumen .....	84
5.3.1.3	Absolute Kapillaroberfläche .....	86

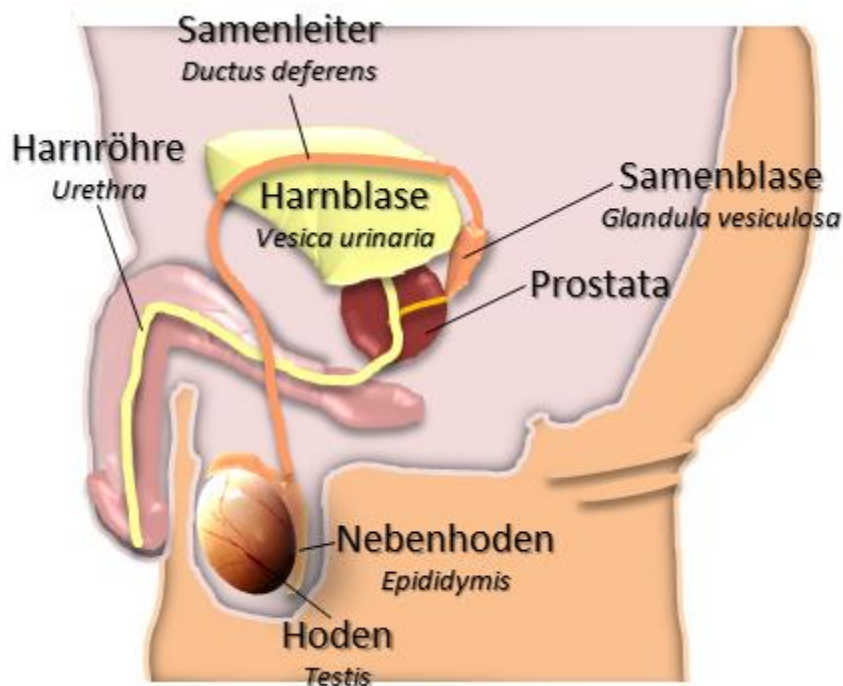
5.3.2	Die Kapillarparameter in ihrer Gesamtheit.....	88
5.3.2.1	Parallelplots.....	88
5.3.2.2	Dreidimensionale Datenverteilung.....	92
<b>5.4</b>	<b>Ergebnisse der Wurfgrößen.....</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>107</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>108</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>109</b>
<b>10</b>	<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>112</b>
<b>11</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>116</b>
<b>12</b>	<b>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....</b>	<b>128</b>
<b>13</b>	<b>ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION.....</b>	<b>130</b>
<b>14</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>131</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Anatomie und Physiologie des Hodens

### 1.1.1 Allgemeines

Zu den inneren Geschlechtsorganen männlicher Wirbeltiere (Abb. 1) gehören der Hoden (Testis), der Nebenhoden (Epididymis), der Samenleiter (Ductus deferens) und die akzessorischen Geschlechtsdrüsen. In den Samenkanälchen (Hodentubuli, Tubuli seminiferi) des Hodens entwickeln sich die Samenzellen, die über das Hodennetz (Rete testis) durch herausführende Kanälchen (Ductuli efferentes) in den Nebenhodengang (Ductus epididymidis), den Hauptbestandteil des Nebenhodens, gelangen. Durch den Nebenhodengang gelangen sie in den Samenleiter und von da aus in die Harnröhre (Urethra), wo ihnen die Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen zugeführt werden, bevor sie als Ejakulat nach außen gelangen (*Holstein in Benninghoff & Drenckhahn 2008*).

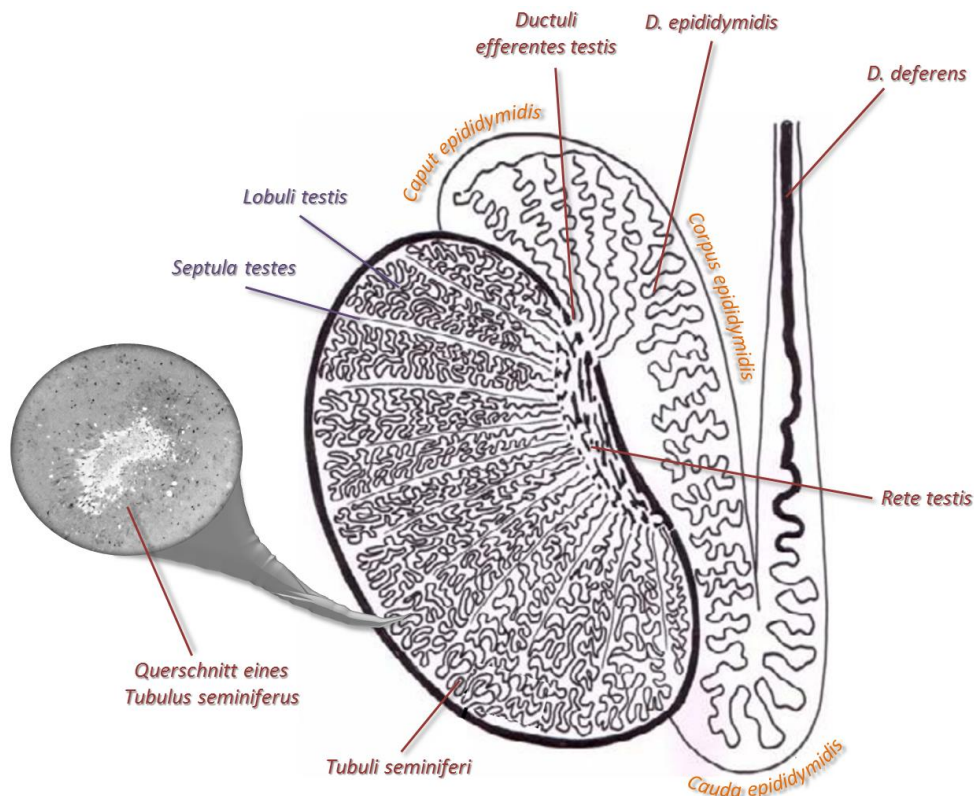


**Abb. 1: Der Weg der Samenzellen**

Die Samenzellen werden im Hoden gebildet und gelangen über seine Ausführungsgänge, über Nebenhodengang, Samenleiter und Harnröhre nach außen.

### 1.1.2 Anatomischer Aufbau des Hodens

Der Hoden (Testis) (Abb. 2) ist die paarig angelegte Keimdrüse (Gonaden) der männlichen Wirbeltiere. Er ist jeweils von einer Bindegewebskapsel, der Tunica albuginea, umgeben. Von der Tunica albuginea ziehen Bindegewebssepten (Septula testis), die Blut- und Lymphgefäße führen, radiär ins Innere des Hodengewebes auf das Rete testis zu und unterteilen das Hodengewebe in Hodenläppchen (Lobuli testis), die das eigentliche Hodenparenchym bilden. Die Hodenläppchen bestehen aus aufgeknäuelten Samenkanälchen (Hodentubuli, Tubuli seminiferi contorti), die in das sich in der Mitte des Hodens (Mediastinum testis) befindende Hodennetz (Rete testis) münden. Zwischen den Spermien-produzierenden Hodentubuli liegt das Interstitium (Zwischengewebe), in dem hormonbildende Leydigzellen, Blut- und Lymphgefäße, Nerven, Makrophagen und Fibroblasten lokalisiert sind (Holstein in Benninghoff & Drenckhahn 2008).



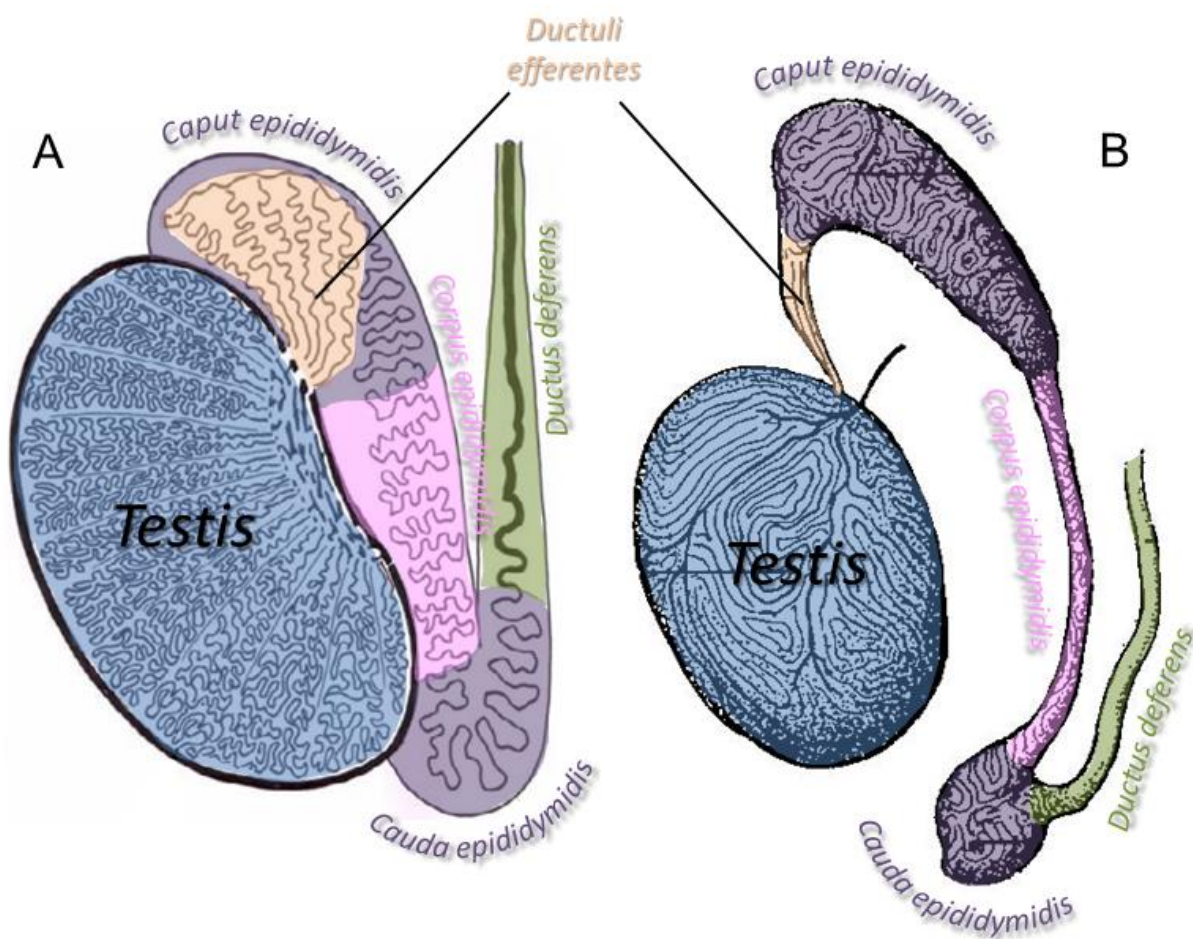
**Abb. 2: Anatomischer Aufbau von Hoden und Samenwegen (Schema)**

Der Hoden wird von Bindegewebssepten (Septula testes) in Hodenläppchen (Lobuli testis) unterteilt, die aus aufgeknäuelten Samenkanälchen (Hodentubuli, Tubuli seminiferi contorti) bestehen, in denen die Samenzellen gebildet werden. Diese gelangen durch das Hodennetz (Rete testis) über die herausführenden Gänge (Ductuli efferentes) in den Nebenhodengang (Ductus epididymidis). Der Nebenhoden, der in Nebenhodenkopf (Caput epididymidis), -körper (Corpus epididymidis) und -schwanz (Cauda epididymidis) gegliedert wird, geht über in den Samenleiter (Ductus deferens).

(Abbildung modifiziert nach Holstein et al. 2003)



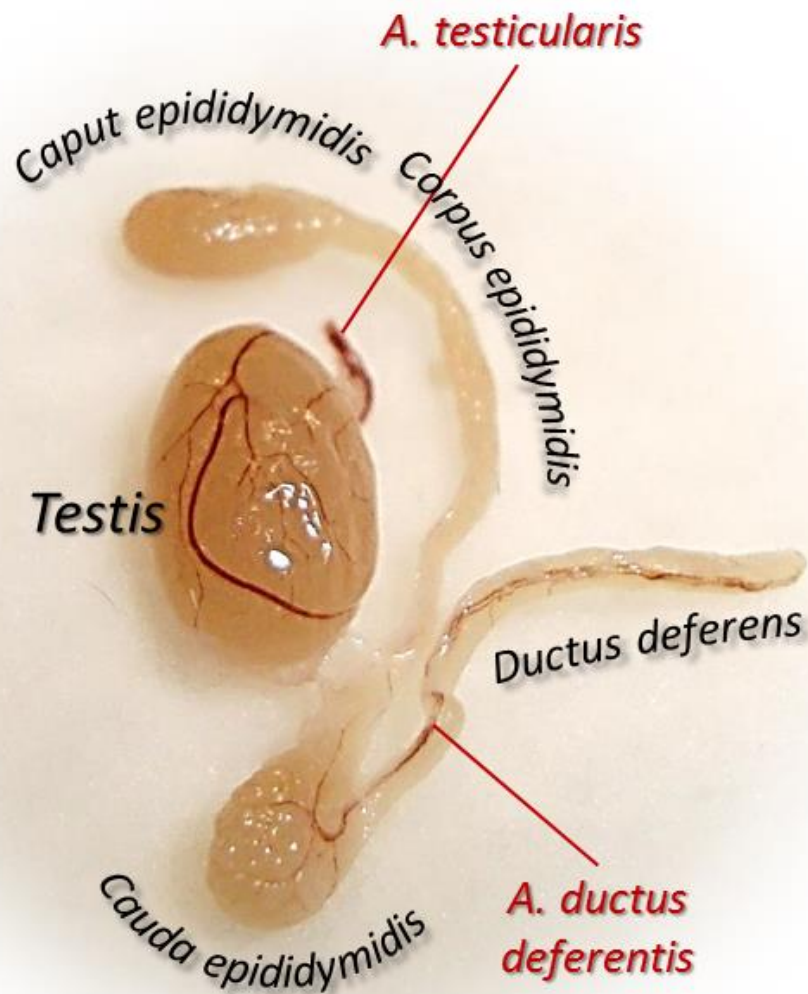
Der Aufbau des Hodens ist bei allen Wirbeltieren ähnlich, wobei sie sich jedoch in Form und Lage unterscheiden (Abb. 3). So sind die Hoden der Maus deutlich runder, Nebenhodenkopf (Caput epididymidis), Nebenhodenkörper (Corpus epididymidis) und Nebenhodenschwanz (Cauda epididymidis) sind deutlich voneinander abgegrenzt und weisen insgesamt eine viel schlankere Form auf als beim Menschen. Der gesamte Nebenhoden liegt bei der Maus deutlich vom Hoden entfernt im epididymalen Fettgewebe, wodurch auch die Lage der murinen Ductuli efferentes sich dementsprechend von den humanen unterscheiden. Auch der Ductus deferens liegt bei der Maus dem Nebenhoden nicht an (Abb. 3 B, 4).



**Abb. 3: Anatomischer Aufbau von Hoden und Nebenhoden von Mensch (A) und Maus (B) im Vergleich (Schema)**

Makroskopische Unterschiede zwischen Mensch (A) und Maus (B) ergeben sich in Form und Lage. So ist bei der Maus – im Gegensatz zum Menschen - der Hoden runder, der Nebenhode deutlich gegliedert und liegt dem Hoden nicht an, sondern etwas entfernt im epididymalen Fettgewebe.

(Abbildung A modifiziert nach Holstein et al. 2003, Abbildung B modifiziert nach Green et al. 1966, Jackson Laboratory 2007)

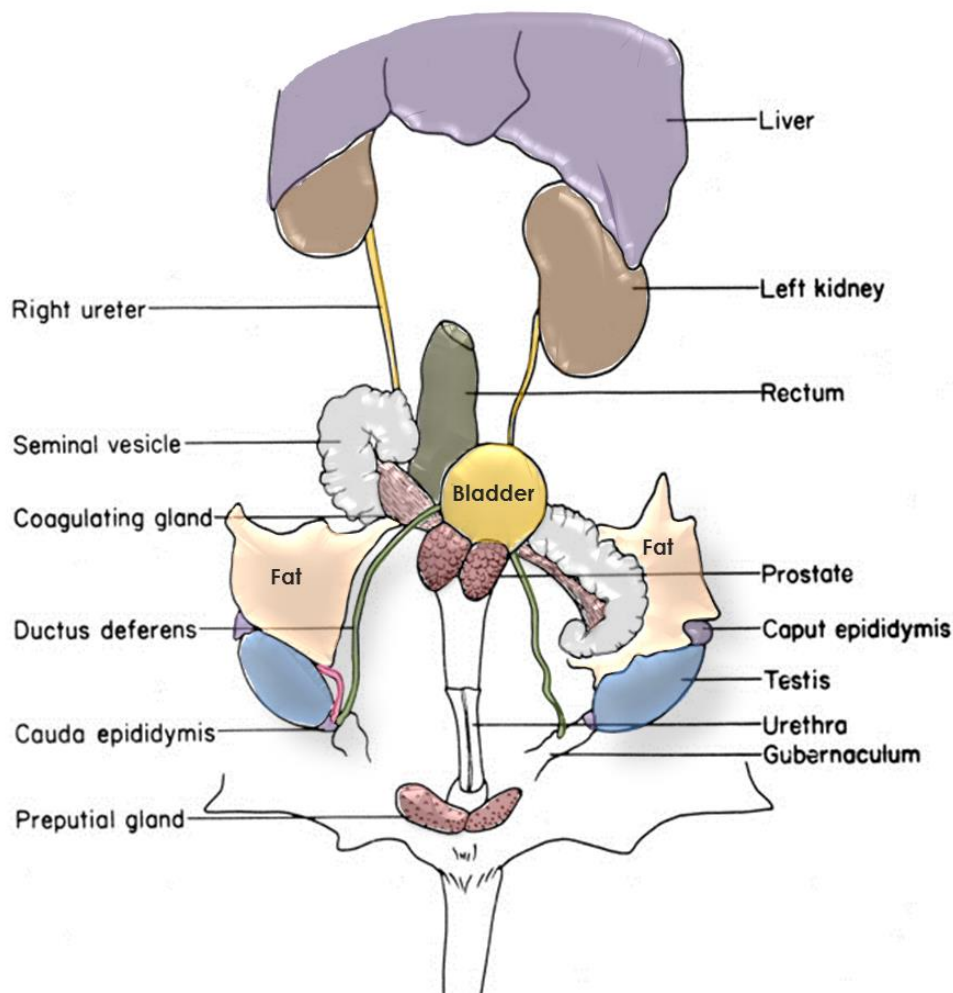


**Abb. 4: Hoden und Nebenhoden der Maus**

Wie in der Schemazeichnung in Abb. 3 B dargestellt, liegt bei der Maus der Nebenhoden deutlich vom Hoden entfernt. Deutlich zu sehen ist der Teil der Hodenarterie (A. testicularis), der den Hoden versorgt, und die A. ductus deferentis, die den Samenleiter (Ductus deferens) begleitet. In situ ist fast der gesamte Nebenhoden im epididymalen Fettgewebe eingebettet (siehe Abb. 7 B). Die dünnen Ductuli efferentes, die den Hoden mit dem Nebenhodenkopf (Caput epididymidis) verbinden (siehe Abb. 3 B) sind bei der Präparation leider im epididymalen Fettgewebe verblieben.

### 1.1.3 Lage der Hoden im Körper der Maus

Die Hoden gehören zum urogenitalen System. Dieses stellt sich im Körper der Maus folgendermaßen dar: unterhalb der Leber liegen die rechte und die linke Niere, die mit dem jeweiligen Ureter (Harnleiter) mit der Harnblase verbunden sind. Hinter der Harnblase sitzen die paarig angelegten Geschlechtsdrüsen, die Samenblase und die Koagulationsdrüse, vor der Blase die Prostata. Die Hoden befinden sich rechts und links unterhalb des inguinalen Fettgewebes (Abb. 5, 6, 7). Die dazugehörigen Nebenhoden sind fast vollständig mit Fettgewebe umgeben, sodass nur Caput und Cauda zu sehen sind. Vom Nebenhodenschwanz zieht jeweils der Samenleiter an der Harnblase entlang und mündet in die Harnröhre. Weiter unten der Harnröhre befindet sich die Präputialdrüse.

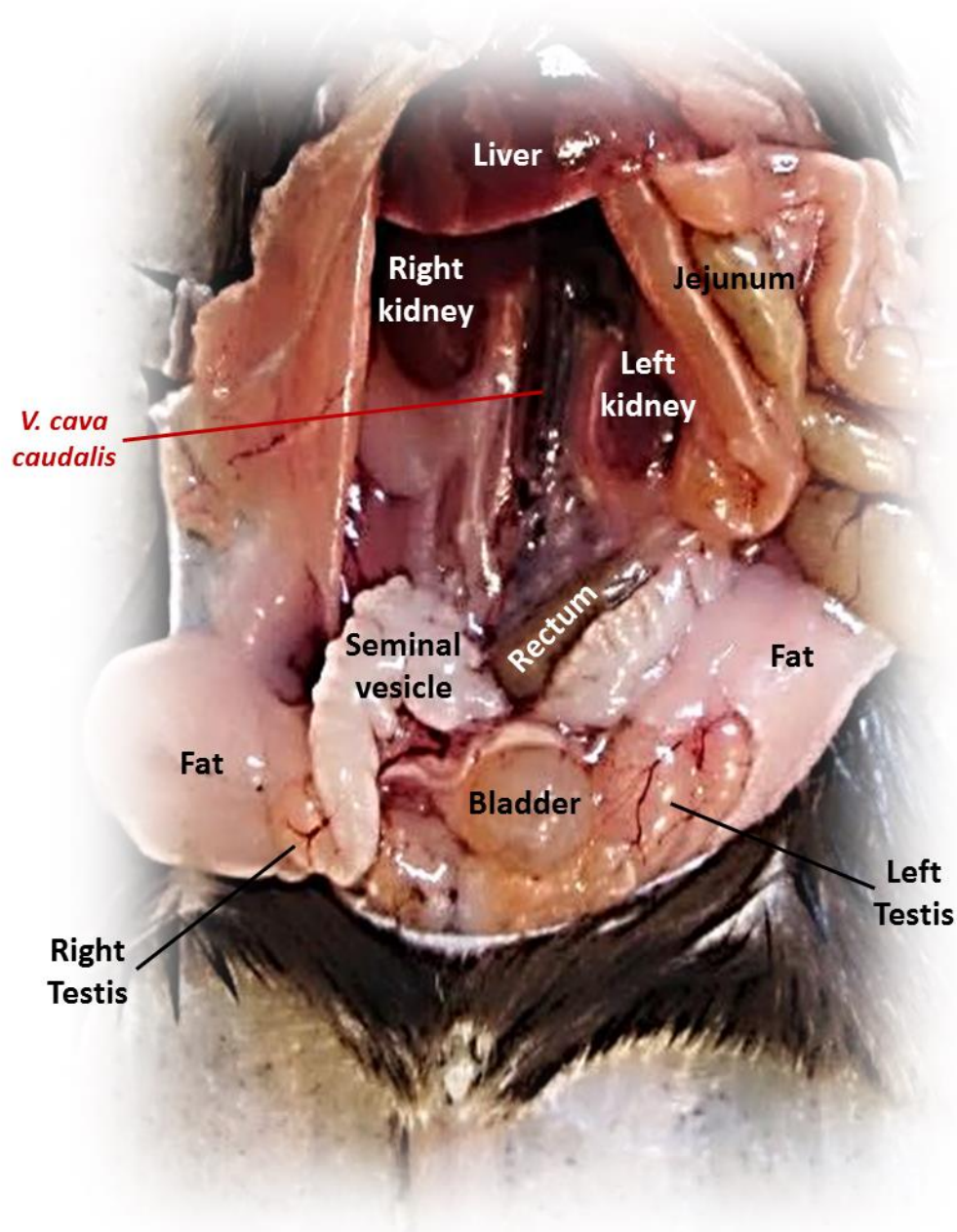


**Abb. 5: Urogenitales System der männlichen Maus (Schema)**

Zum urogenitalen System gehören einerseits die Nieren, die Harnleiter, Harnblase und Harnröhre, andererseits Hoden mit Nebenhoden und Samenleiter, und die akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Samenblase, Koagulationsdrüse, Prostata und Präputialdrüse).

(Abbildung modifiziert nach Cook 1965, Jackson Laboratory 2005)

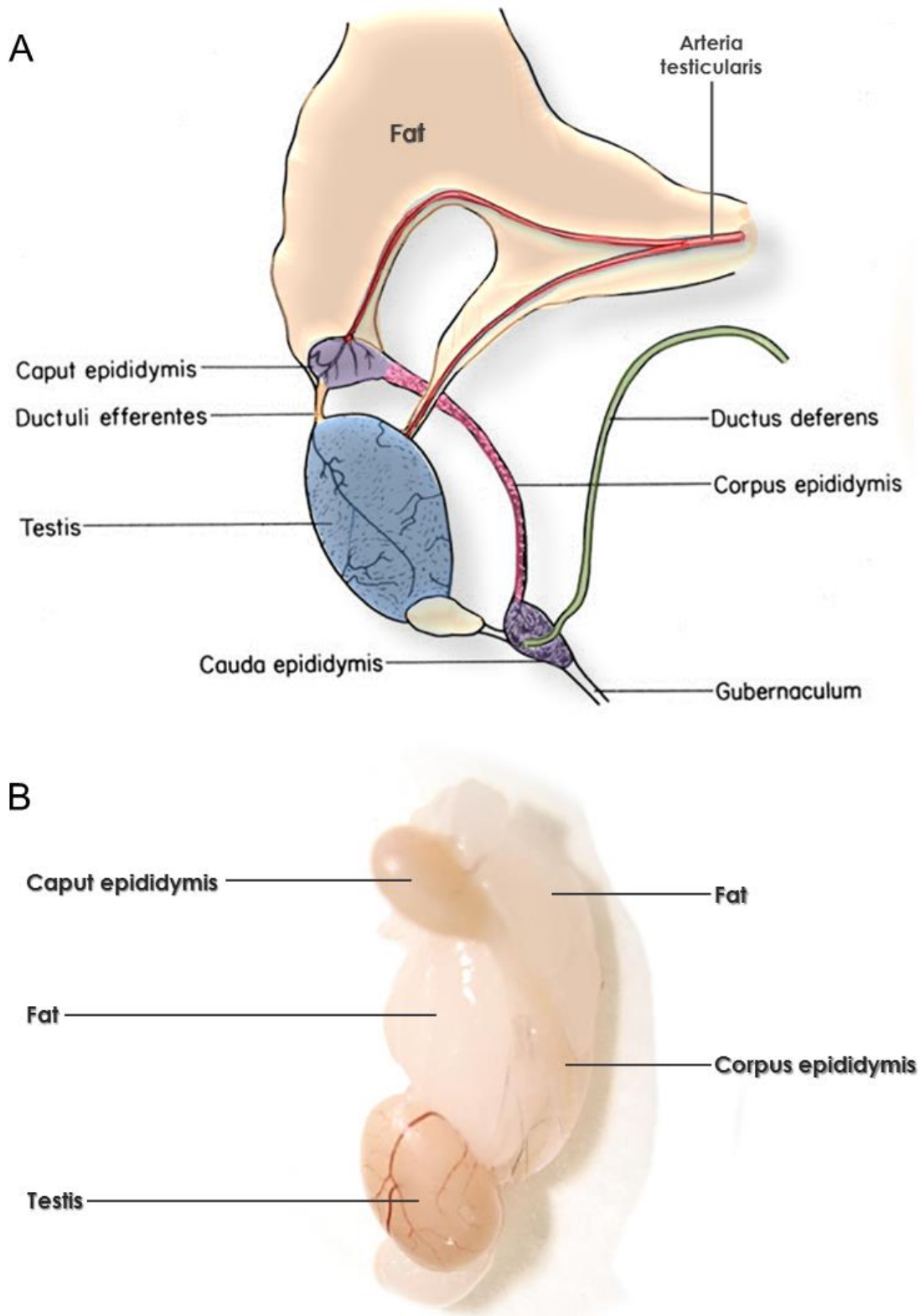




**Abb. 6: Urogenitales System der männlichen Maus (in situ)**

Für das Foto wurde das Abdomen eröffnet und aufgeklappt, der Darm ist am Rectum abgetrennt und die Dünndarmschlingen (Jejunum) zur Seite gelegt. Das inguinale Fettgewebe wurde ebenfalls seitlich verlagert.

Wie in der Schemazeichnung in Abb. 5 beschrieben, sind die betreffenden Organe in situ aufzufinden. Nebenhoden und Samenleiter (D. deferens) sind vom Fettgewebe umgeben und ohne Präparation nicht sichtbar. Die Präputialdrüse ist von der Bauchdecke verdeckt. Nach Verlagern der Darmschlingen ist die in der Körpermedianen verlaufende hintere Hohlvene (V. cava caudalis) gut sichtbar, die für unsere Untersuchungen eine wichtige Rolle spielt (siehe Methoden).



**Abb. 7: Lage des rechten Hodens und Nebenhodens**

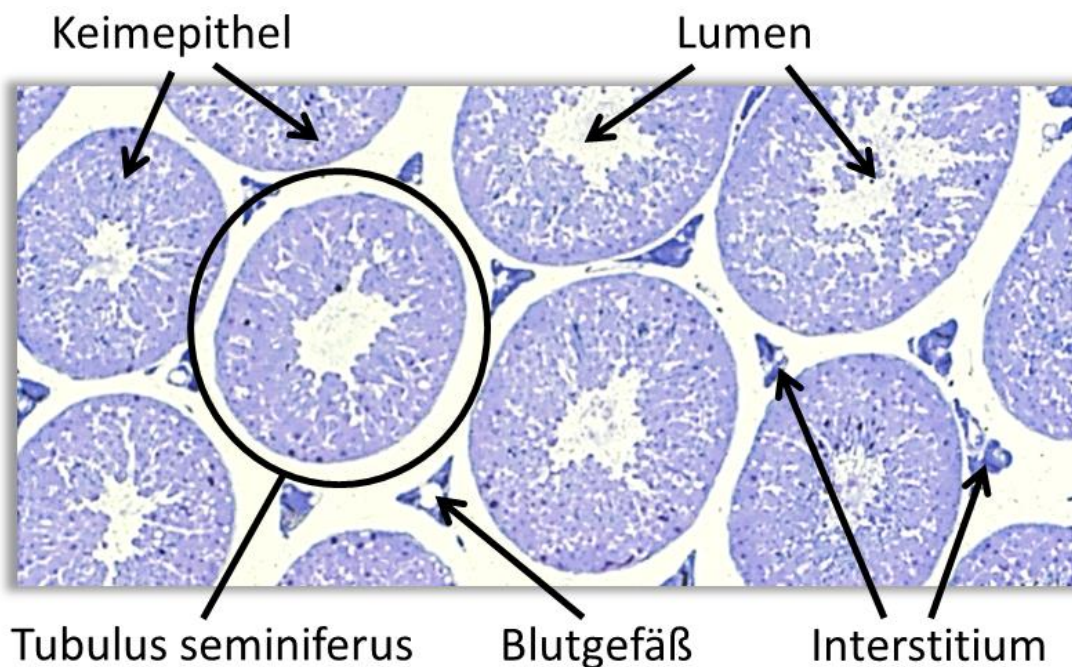
Lage des rechten Hodens und Nebenhodens als Schema (A). In situ ist der Nebenhodenkörper vom epididymalen Fettgewebe komplett umgeben (B).

(Abbildung A modifiziert nach Cook 1965, Jackson Laboratory 2005)

### 1.1.4 Hodentubuli und Spermatogenese

Die Hodentubuli (Tubuli seminiferi contorti, Samenkanälchen) (Abb. 8) bestehen aus dem Keimepithel und der sie außen umhüllenden myofibrösen Lamina propria. Das Keimepithel wiederum besteht aus Keimzellen und Stützzellen (Sertolizellen).

Im Keimepithel vermehren sich die Keimzellen und differenzieren sich durch Reifeteilung zu Samenzellen (Spermien). Dieser Prozess nennt sich Spermatogenese (Samenzellbildung) und wird u.a. von FSH (follikelstimulierendes Hormon), LH (luteinisierendes Hormon) und Testosteron hormonell reguliert (*Holstein in Benninghoff & Drenckhahn 2008*).



**Abb. 8: Histologie des Hodenparenchyms**

Dieser Methylenblau-gefärbte histologische Semidünnschnitt stellt einen Ausschnitt des Hodenparenchyms dar. Es sind deutlich die Querschnitte der aufgeknäuelten Hodentubuli und der im Interstitium (Zwischengewebe) liegenden Blutgefäße zu erkennen. An den Rändern der Lumina befinden sich teilweise fertige Spermatozoen. Die dunkelblau-gefärbten Punkte innerhalb des Keimepithels sind die Zellkerne der verschiedenen Zelltypen. (Vergrößerung: Ok.10, Obj.20)

Die Spermatogenese ist ein kontinuierlicher Vorgang, bei dem verschiedene Stadien durchlaufen werden und der mit den Spermatogonien beginnt (*Holstein in Benninghoff & Drenckhahn 2008*). Diese Zellen bilden die basale Schicht des Keimepithels und werden in die Stammzellen der Samenbildung (Spermatogonien Typ A) und in einen weiterentwickelten Zelltyp (Spermatogonien Typ B) eingeteilt.

Die Spermatogonien Typ B ( $2n/2c$ ) differenzieren sich durch DNA-Synthese zu Spermatozyten I ( $2n/4c$ ), bei denen der normale diploide Chromosomensatz vorliegt.

Durch die Teilung jeder Spermatozyte I entstehen jeweils zwei Spermatozyten II. Dabei kommt bei der ersten meiotischen Teilung von den jeweiligen Chromosomenpaaren jeweils ein homologes Chromosom auf jede der zwei entstehenden Tochterzellen.

In diesem Stadium der Reifeteilung erfolgt keine DNA-Verdopplung, sodass bei der zweiten meiotischen Teilung die entstehenden Tochterzellen jeweils eine Chromatide von jedem Chromosom erhalten.

Die abgerundeten Spermatiden, die die kleinsten Zellen im Keimepithel darstellen und in der Nähe des Lumens eines Hodentubulus liegen, differenzieren sich zu reifen Spermatiden, die als eine Transportform der Keimzellen fungieren. Diese komplizierte Differenzierung besteht aus drei Entwicklungsvorgängen, die zeitgleich innerhalb der Spermatide ablaufen: die Kernkondensation, die Akrosombildung und die Entwicklung der Geißel.

Nach Ausreifung aller Strukturen werden die Spermatiden aus dem Keimepithel ins Lumen der Hodentubuli entlassen (Spermatio) und ab diesem Zeitpunkt als Spermatozoen bezeichnet. Die Zytoplasmareste der Spermatiden werden als Residualkörper von den Sertolizellen im Keimepithel abgebaut (*Holstein in Benninghoff & Drenckhahn 2008*).

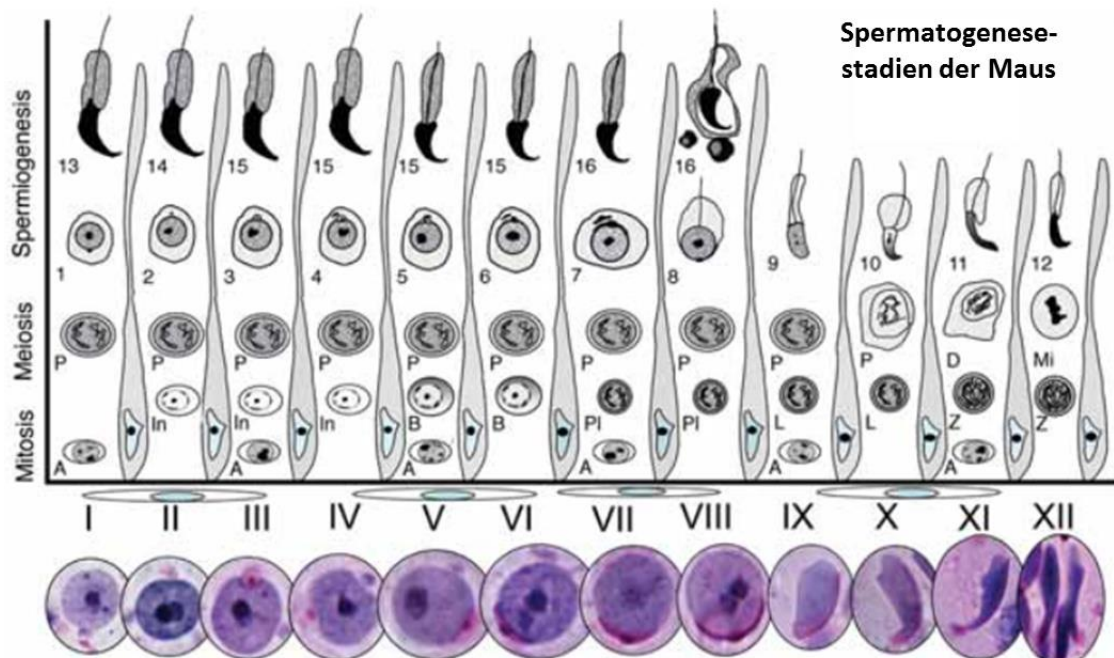


#### 1.1.4.1 Die verschiedenen Spermatogenesestadien und ihre Differenzierung

Bei der Samenzellproduktion vermehren sich die Keimzellen und differenzieren sich durch Reifeteilung zu Spermatozoen. Damit die kontinuierliche Zufuhr von Spermien jedoch gewährleistet werden kann, muss dieser Vorgang zu unterschiedlichen Zeiten parallel ablaufen, sodass an jeder beliebigen Stelle im Keimepithel bestimmte Konstellationen von Zellgruppen unterschiedlicher Entwicklungsstufen vorliegen. Diese Entwicklungsstufen werden als „Stadien“ bezeichnet und treten im Querschnitt eines Hodentubulus des Menschen unterschiedlich weit vorangeschritten nebeneinander auf (Holstein in Benninghoff & Drenckhahn 2008).

Beim Menschen werden sechs dieser Stadien unterschieden. Überall im Keimepithel ist in einem Zyklus von 16 Tagen nach Durchlaufen der sechs Stadien wieder die gleiche Konstellation von Zellgruppen vorhanden, was als Spermatogenesezyklus bezeichnet wird. Die Entwicklung von der Spermatogonie bis zum Spermatozoon beträgt 4,5 Zyklen und dauert demnach 74 Tage (Holstein in Benninghoff & Drenckhahn 2008).

Bei der Maus können zwölf Spermatogenesestadien unterschieden werden (Abb. 9), wobei die Zykluslänge jeweils 8,6 Tage beträgt (Russell et al. 1993, França et al. 1998; Hess & de França 2008).



**Abb. 9: Spermatogenesestadien der Maus**

Bei der Maus werden zwölf Spermatogenesestadien unterschieden. Ein Spermatogenesezyklus dauert jeweils 8,6 Tage.

(Abbildung modifiziert nach Hess & de França 2008)



#### 1.1.4.2 Sertolizellen

Die Sertolizellen sitzen auf der Basalmembran des Hodentubulus und reichen mit ihren dicht verzweigten Fortsätzen bis zu seinem Lumen (*Holstein in Benninghoff & Drenckhahn 2008*) (Abb. 10). Dadurch umgeben sie das Keimepithel, welches sie durch Zellverbindungen untereinander in ein basales und ein lumbinales Kompartiment gliedern und damit als Blut-Hoden-Schranke fungieren, die somit die im lumbinalen Kompartiment heranreifenden Spermatiden vor schädigenden Substanzen schützt.

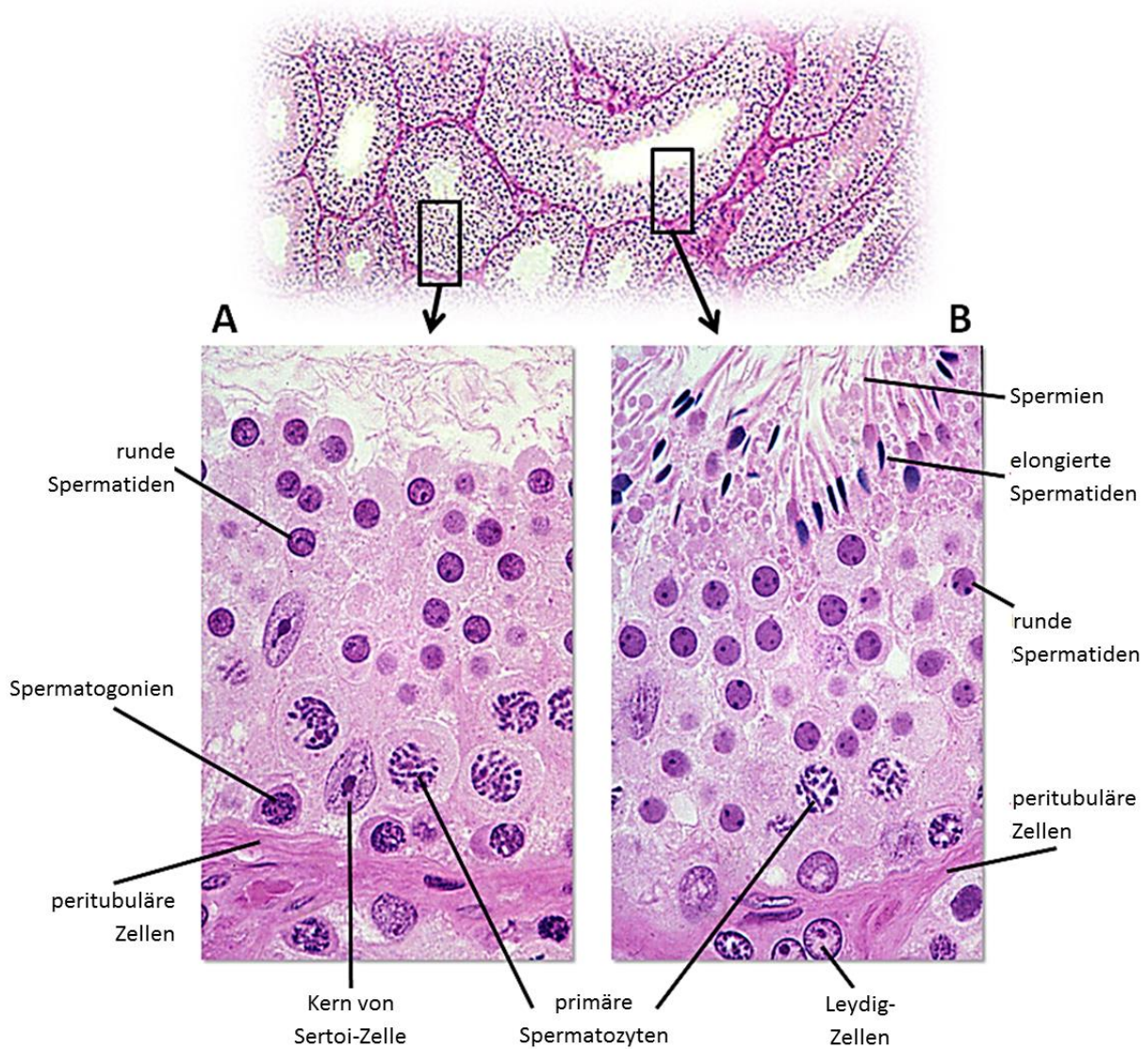
Weiterhin übernehmen Sertolizellen wichtige Funktionen in Bezug auf den Abbau degenerierter Spermatozyten und den gerichteten Transport der Spermatiden zum Tubuluslumen. Sie produzieren ein wichtiges Androgen-bindendes Protein (ABP) zur Steuerung der Spermatogenese und können durch Ausschüttung des Proteins Inhibin die Bildung des Sertolizellen-stimulierenden Hormons FSH (Follikel-stimulierendes Hormon) in der Hypophyse hemmen. Des Weiteren stehen die Sertolizellen in Kommunikation mit Leydigzellen (*Holstein in Benninghoff & Drenckhahn 2008*).

#### 1.1.4.3 Leydig-Zwischenzellen

Die Leydig-Zwischenzellen (kurz: Leydigzellen) stellen die größten Zellen im Interstium des Hodens dar. Sie sind polygonal und haben einen runden Zellkern mit kleinem Nukleolus (*Holstein in Benninghoff & Drenckhahn 2008*) (Abb. 10, 11).

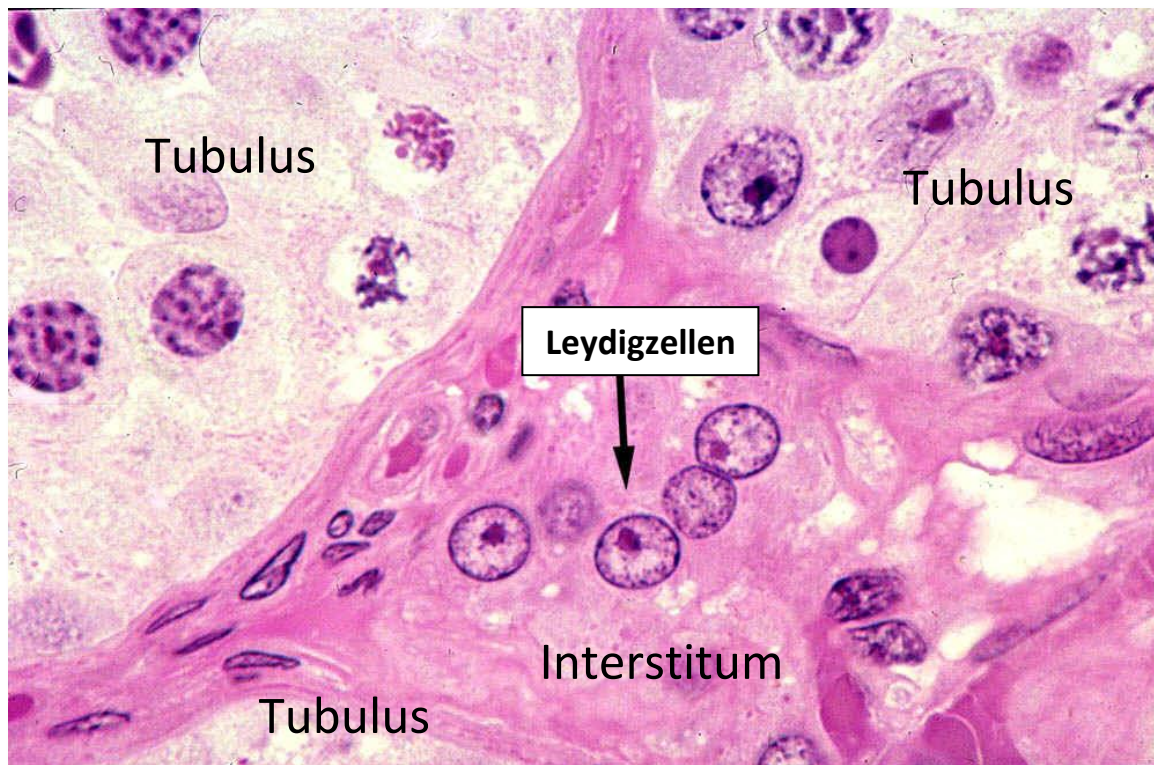
Die Hauptfunktion dieser Zellen ist die Produktion von männlichen Sexualhormonen, insbesondere des Testosteron. Dieses wird direkt nach seiner Herstellung von den Leydigzellen in den intertubulären Raum abgegeben, von wo es entweder von den Blut- und Lymphgefäßen aufgenommen und im Körper verteilt wird oder durch die Lamina propria der Hodentubuli ins Keimepithel gelangt. Über die Blutbahn wirkt es auf die ableitenden Samenwege, die akzessorischen Geschlechtsdrüsen, auf die sekundären Geschlechtsmerkmale, die Talgdrüsenfunktion, auf anabole Stoffwechselprozesse, auf Libido, Potenz und geschlechtsspezifische Verhaltensweisen.

Leydigzellen sind auf neuroendokriner Ebene für die Regulation der Steroidsynthese und für die Durchblutung und die Permeabilität der Hodengefäße zuständig und haben Einfluss auf die Kontraktilität der peritubulären Myofibroblasten der Hodentubuli, den Spermientransport aus dem Hoden und auf die Synthese der Keimzellen, indem sie mit den Sertolizellen kommunizieren (*Holstein in Benninghoff & Drenckhahn 2008*).



**Abb. 10: Tubuluswand und Keimepithel**

A: mit Sertolizellen, Spermatogonien, primären Spermatozyten und frühen (runden) Spermatiden  
 B: mit späten (elongierten) Spermatiden und Spermien am luminalen Rand des Keimepithels  
 (Abbildung modifiziert nach [www.mh-hannover.de/kurspraeparate.html](http://www.mh-hannover.de/kurspraeparate.html))



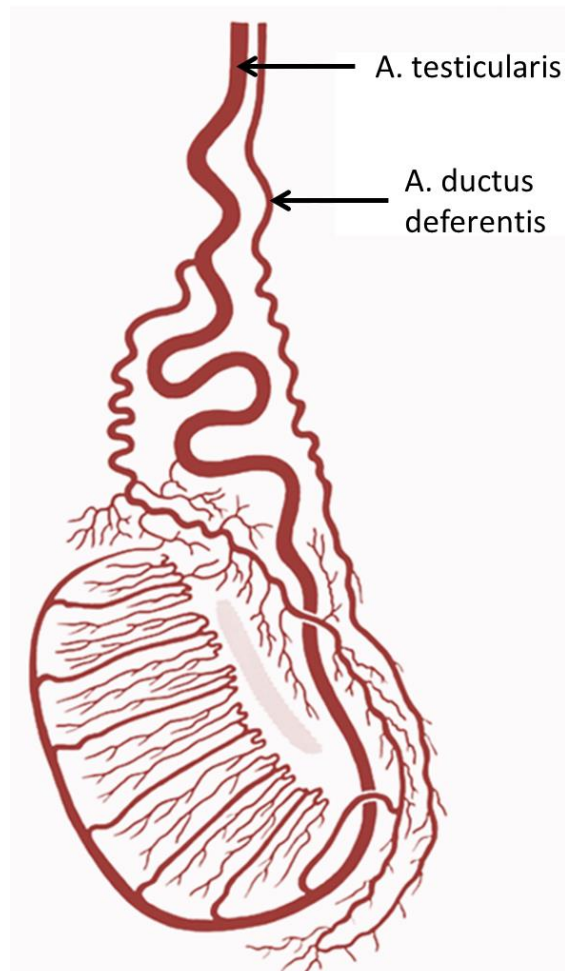
**Abb. 11: Leydigzellen**

Die Abbildung zeigt Leydigzellen (Pfeil) im Interstitium zwischen drei Hodentubuli (Tubuli seminiferi).

(Abbildung modifiziert nach [www.mh-hannover.de/kurspraeparate.html](http://www.mh-hannover.de/kurspraeparate.html))

### 1.1.5 Gefäßversorgung des Hodens

Die Hodenarterie (A. testicularis) entspringt der abdominalen Aorta. Außerhalb des Leistenkanals (Canalis inguinalis) spaltet sich die Hodenarterie in zwei bis drei Äste auf. Während die einen davon den Samenleiter (Ductus deferens) begleiten und den Nebenhoden (Epididymis) versorgen, zieht der Hauptast zum Hoden (*Holstein in Benninghoff & Drenckhahn 2008*) (Abb. 12).



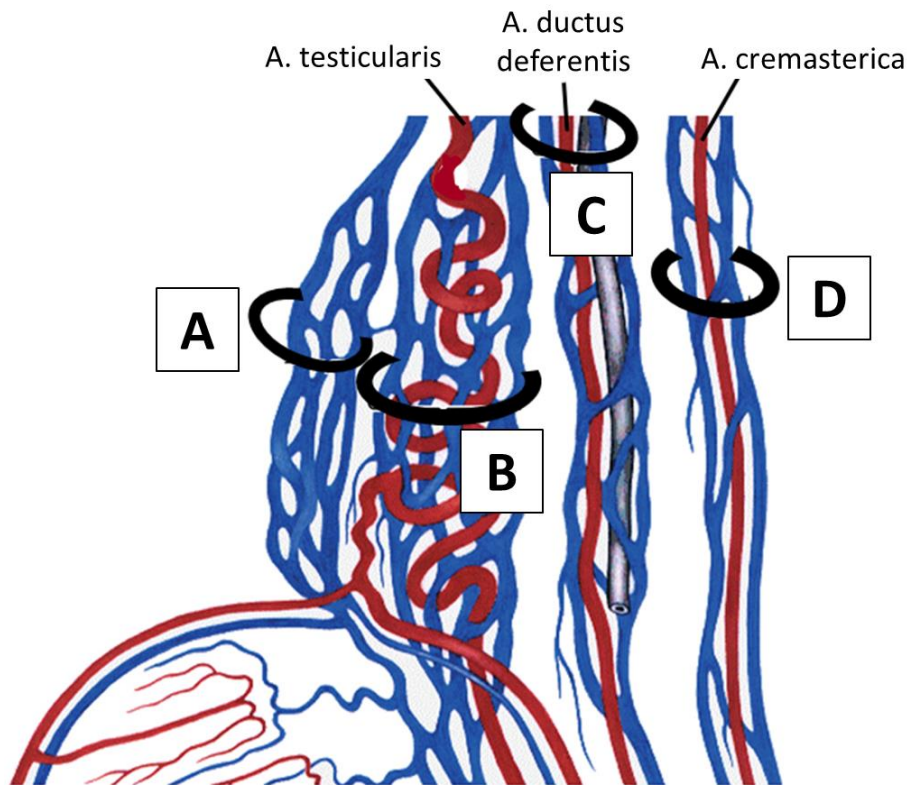
**Abb. 12: Verlauf der A. testicularis zum Hoden (Mensch)**

Nach ihrer Aufspaltung außerhalb des Leistenkanals zieht der Hauptast der Arteria testicularis zum Hoden.

(Abbildung modifiziert nach Holstein in Benninghoff & Drenckhahn 2008)



Während beim Menschen die lange und geknäuelte Testikulararterie von einer Vielzahl von Venen des Plexus pampiniformis umgeben ist (Abb. 13), sind diese Gefäße bei Nagern, wie der Maus, umgeben vom M. cremaster (Dyce et al. 2010).

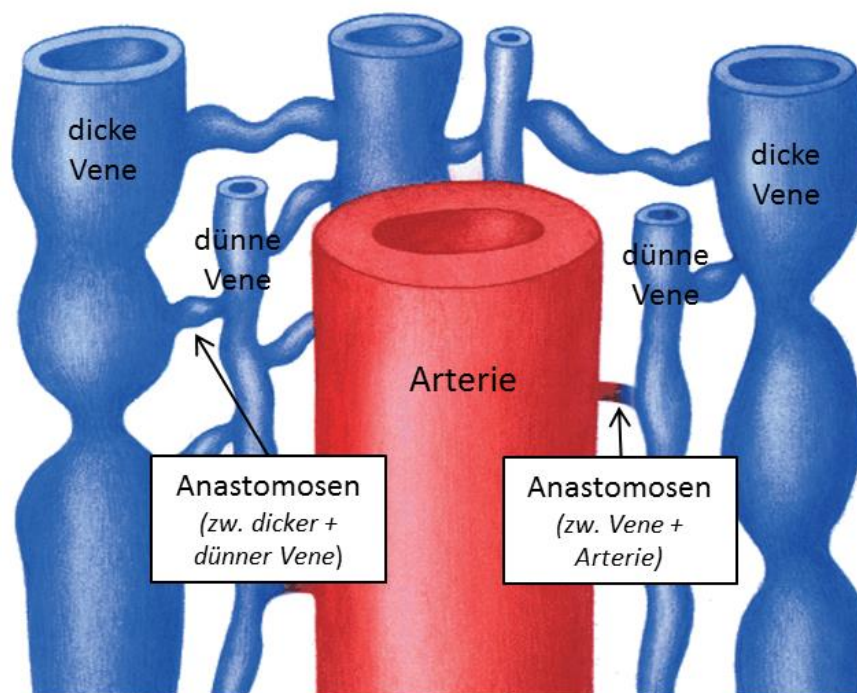


**Abb. 13: Venenplexus am menschlichen Hoden**

A: eigenständiger Venenplexus; B: Venenplexus um die A. testicularis; C: Venenplexus um die A. ductus deferentis; D: Venenplexus um die A. cremasterica.

(Abbildung modifiziert nach Holstein in Benninghoff & Drenckhahn 2008)

Die einzelnen Arterienäste, A. testicularis, A. ductus deferentis und A. cremasterica, werden jeweils von Venenplexus des Plexus pampiniformis umgeben (Holstein in Benninghoff & Drenckhahn 2008). Diese Venenplexus bestehen jeweils aus dicken und dünnen Venen, die untereinander Verbindungen (Anastomosen) ausbilden. Diese Anastomosen können auch zwischen den Venen und den sie begleitenden Arterien bestehen (veno-arteriöse Anostomosen) (Abb. 14). Dadurch kommt ihnen neben ihrer Funktion zur Blutdruck- und Wärmeregulation eine wichtige Bedeutung im „Testosteronkreislauf“ des Hodens zu: testosteronreiches Blut wird aus den Venen durch die veno-arteriösen Anostomosen in die A. testicularis geführt und zum Hoden zurückgeleitet (Abb. 15, 16, 17), um dort für die Regulierung der Hodenfunktion zu wirken (Holstein in Benninghoff & Drenckhahn 2008).

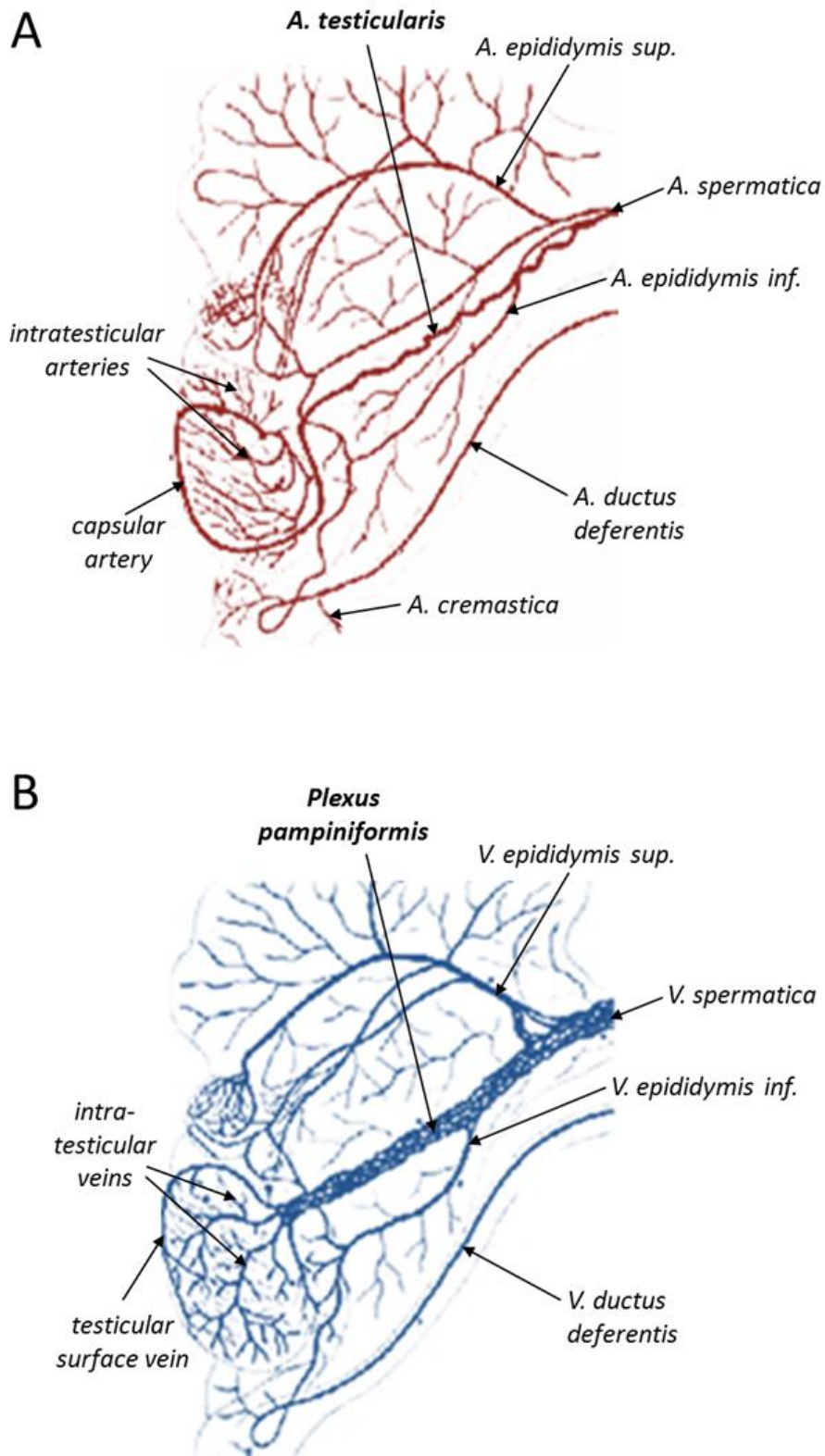


**Abb. 14: Venenplexus der einzelnen Arterien im menschlichen Hoden**

Jede Arterie wird jeweils von dicken und dünnen Venen begleitet. Die Venen bilden Verbindungen (Anastomosen) untereinander und mit der sie begleitenden Arterie.

(Abbildung modifiziert nach Holstein in Benninghoff & Drenckhahn 2008)

Dabei ermöglicht der vaskuläre Aufbau des Samenstranges einen Gegenstrom, durch den ein Wärmeaustausch stattfindet, der das ankommende arterielle Blut herunterkühlt bevor es in den Hoden gelangt (Waites & Moule 1967).



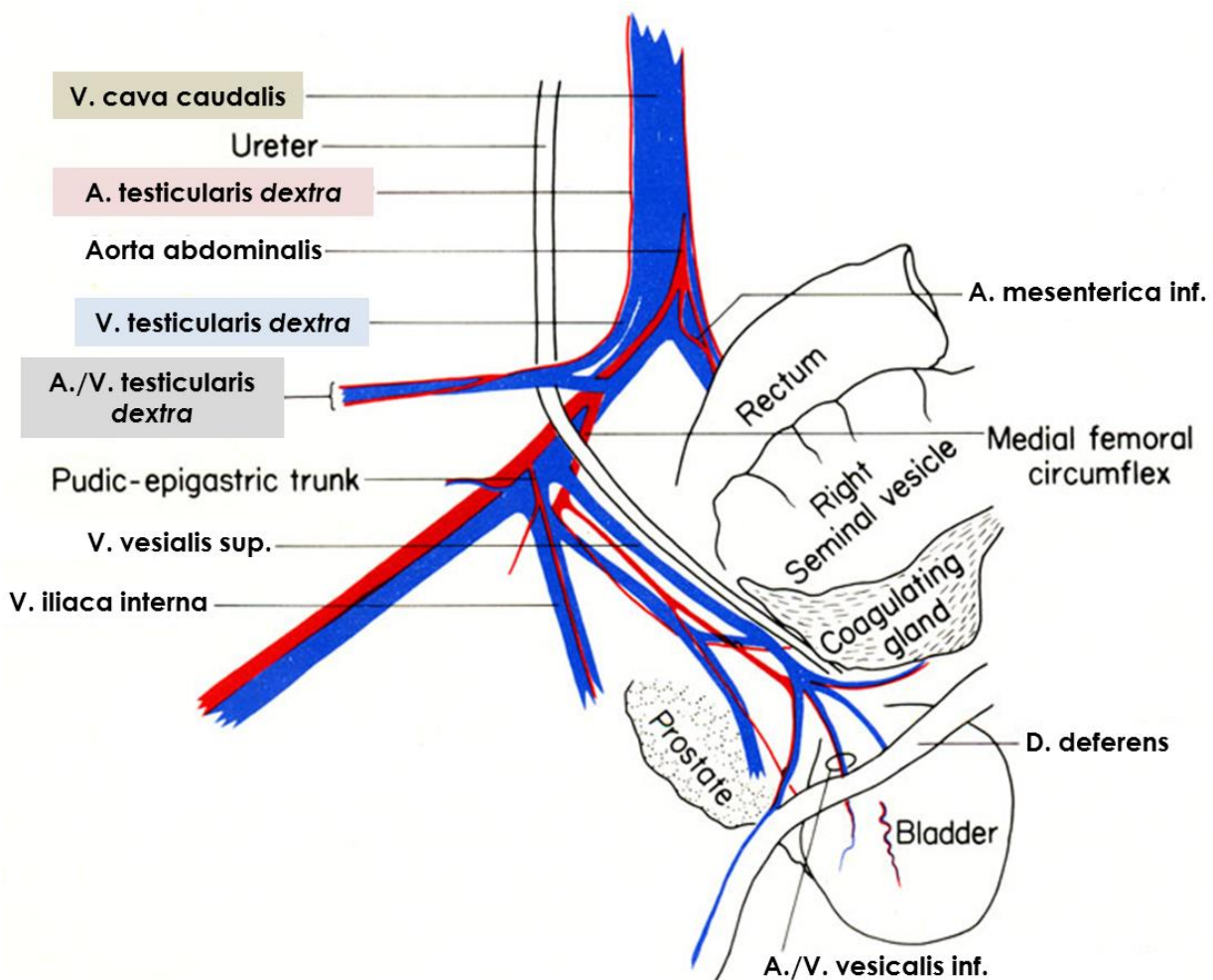
**Abb. 15: Blutversorgung von Hoden, Nebenhoden und Samenstrang der Maus**

A: Arterielle Versorgung

B: Venöser Abfluss

(Abbildung modifiziert nach Chubb & Desjardins 1982)

Am Hilus des Hodens führt die A. testicularis in den Hoden hinein und weitet sich innerhalb seiner Bindegewebskapsel (Tunica albuginea) aus, wobei weitere Äste innerhalb der bindegewebigen Hodensepten (Septula testis) fast bis zum Rete testis ziehen und rückläufig als Aa. recurrens die Hodentubuli in den Hodenläppchen (Lobuli testis) versorgen. Aus jeder A. recurrens entstammen Aa. segmentales. Diese versorgen jeweils einen Abschnitt eines Hodenläppchens und gehen in das kapillare Gefäßsystem über (Holstein in Benninghoff & Drenckhahn 2008).



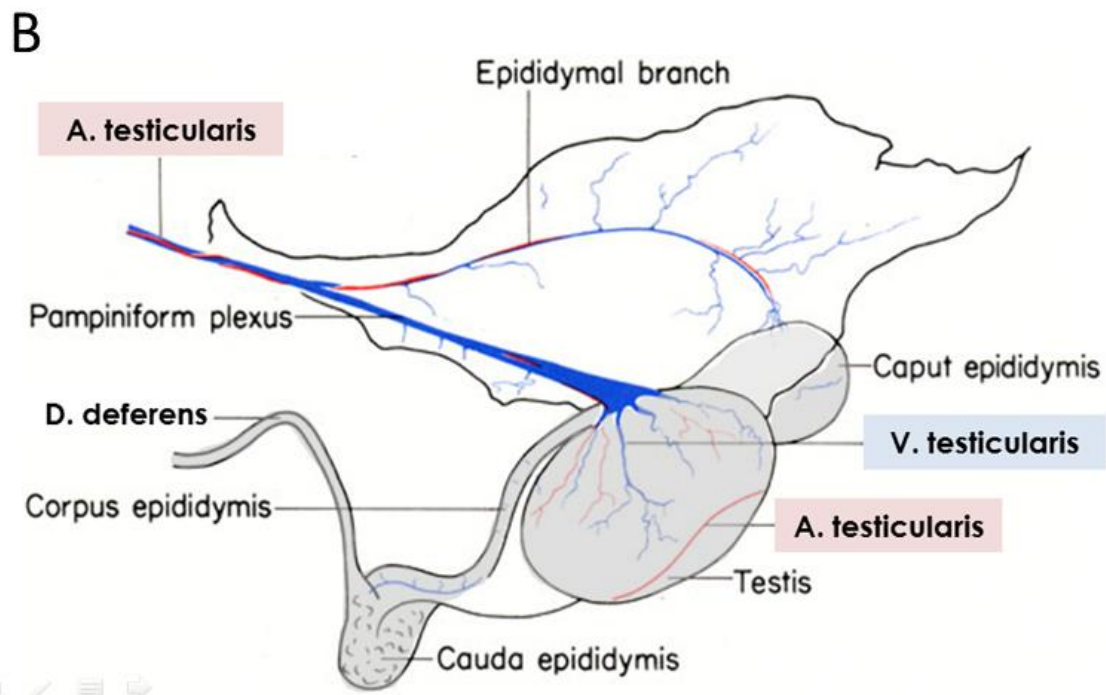
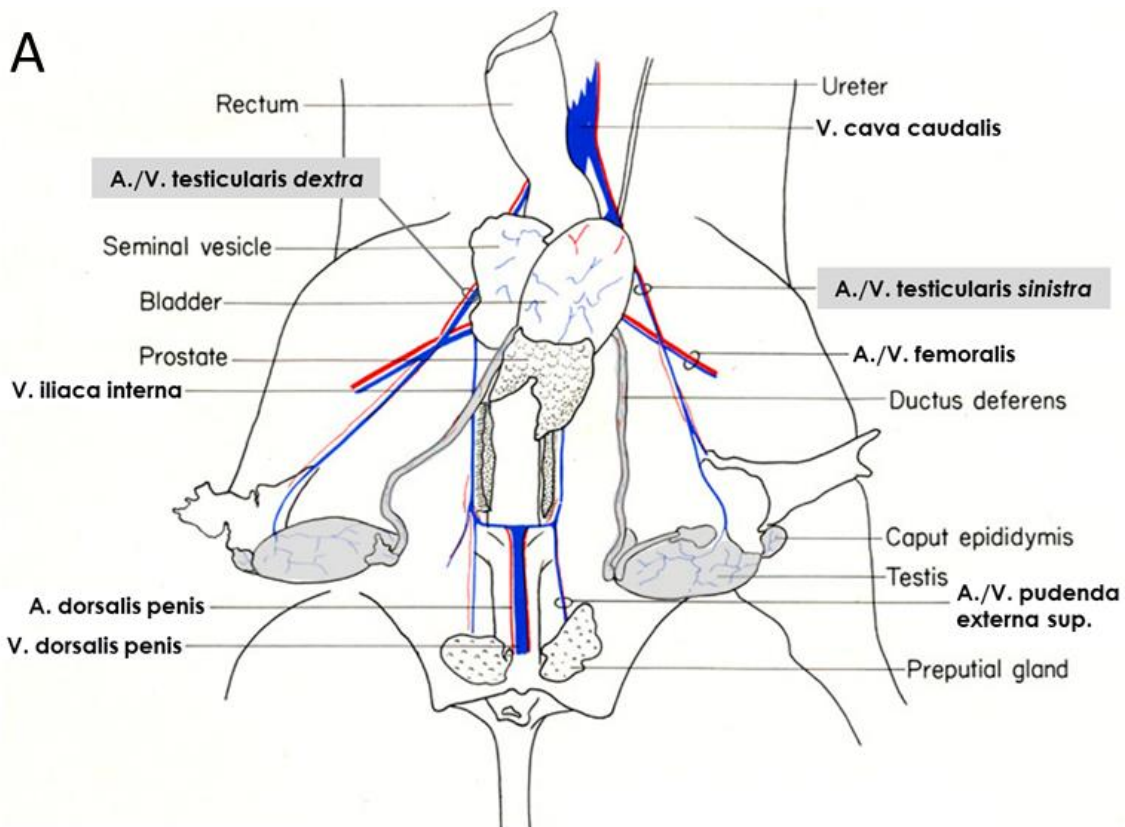
**Abb. 16: Blutversorgung des urogenitalen Systems der männlichen Maus**

Die von der abdominalen Aorta kommende A. testicularis teilt sich in eine rechte (A. testicularis dextra) und eine linke (A. testicularis sinistra) Hodenarterie auf. Außerhalb des Leistenkanals spalten diese sich nochmals auf und versorgen Hoden, Nebenhoden und Samenleiter (hier nicht abgebildet).

Hier gut zu erkennen, ist die hintere Hohlvene (V. cava caudalis), die für unsere Untersuchungen ebenfalls sehr wichtig ist (siehe Methoden). (Auf der Abbildung sind die Organe nach links verlegt, um die Blutversorgung besser zeigen zu können.)

(Abbildung modifiziert nach Cook 1965, Jackson Laboratory 2005)





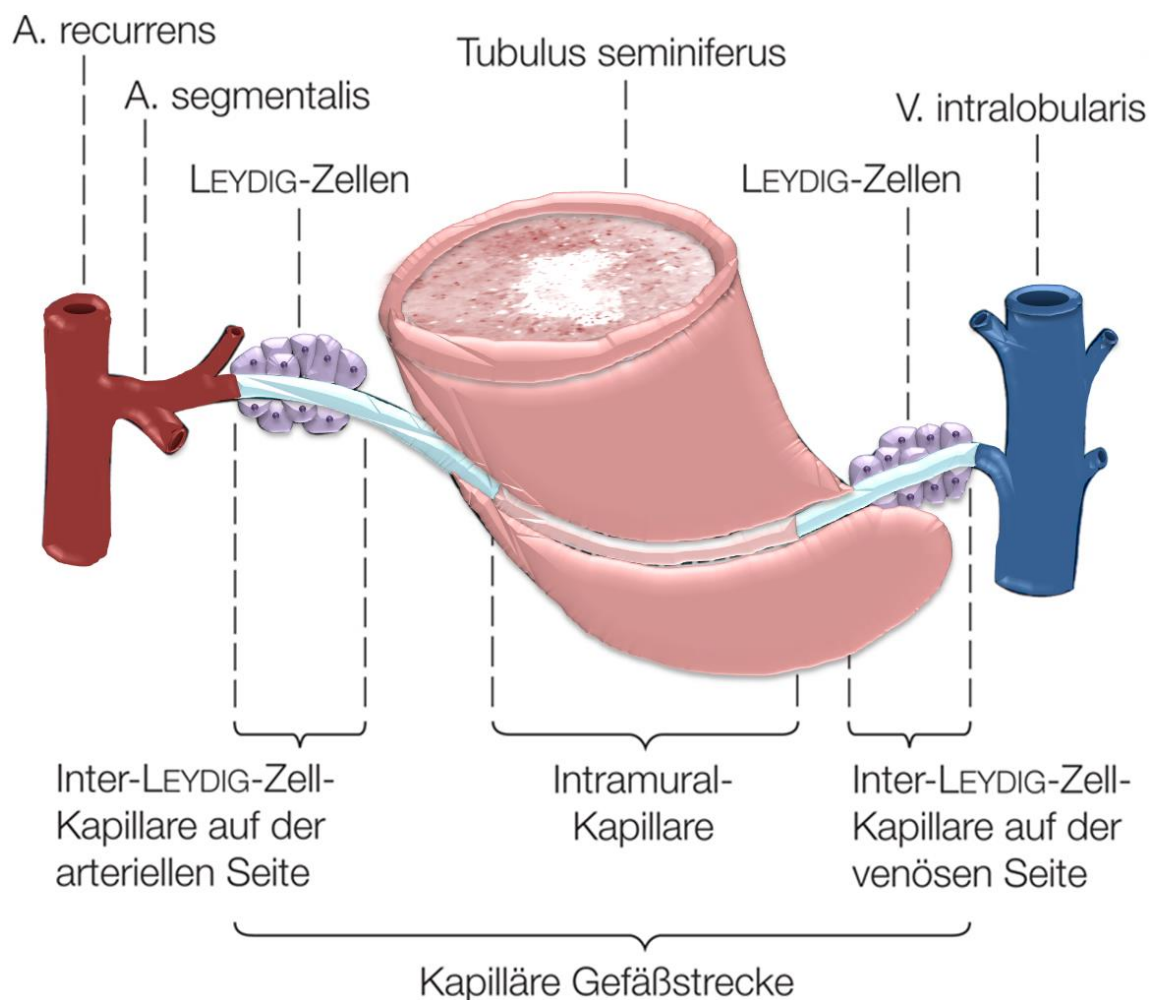
**Abb. 17: Blutversorgung der Reproduktionsorgane der männlichen Maus**

Arteria und V. testicularis teilen sich jeweils in eine Arteria und V. testicularis dextra und sinistra auf (A) und ziehen zu dem entsprechenden Hoden und Nebenhoden (B).

(A: linke Samenblase entfernt, rechte Samenblase abgetrennt)

(Abbildung modifiziert nach Cook 1965, Jackson Laboratory 2005)

Die kapillare Gefäßstrecke ist unterteilt in Inter-Leydig-Zell-Kapillaren der arteriellen und der venösen Seite und den dazwischenliegenden Intramuralkapillaren (Abb. 18). Die Intramuralkapillaren befinden sich in der Wand der Hodentubuli und sind für den Stoffaustausch mit dem Keimepithel fenestriert. Das Ausmaß dieser endothelialen Fenestrierungen ist abhängig vom Gefäßendothel-Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor, VEGF), der wiederum in den Sertoli- und Leydigzellen gebildet wird (Holstein in Benninghoff & Drenckhahn 2008).

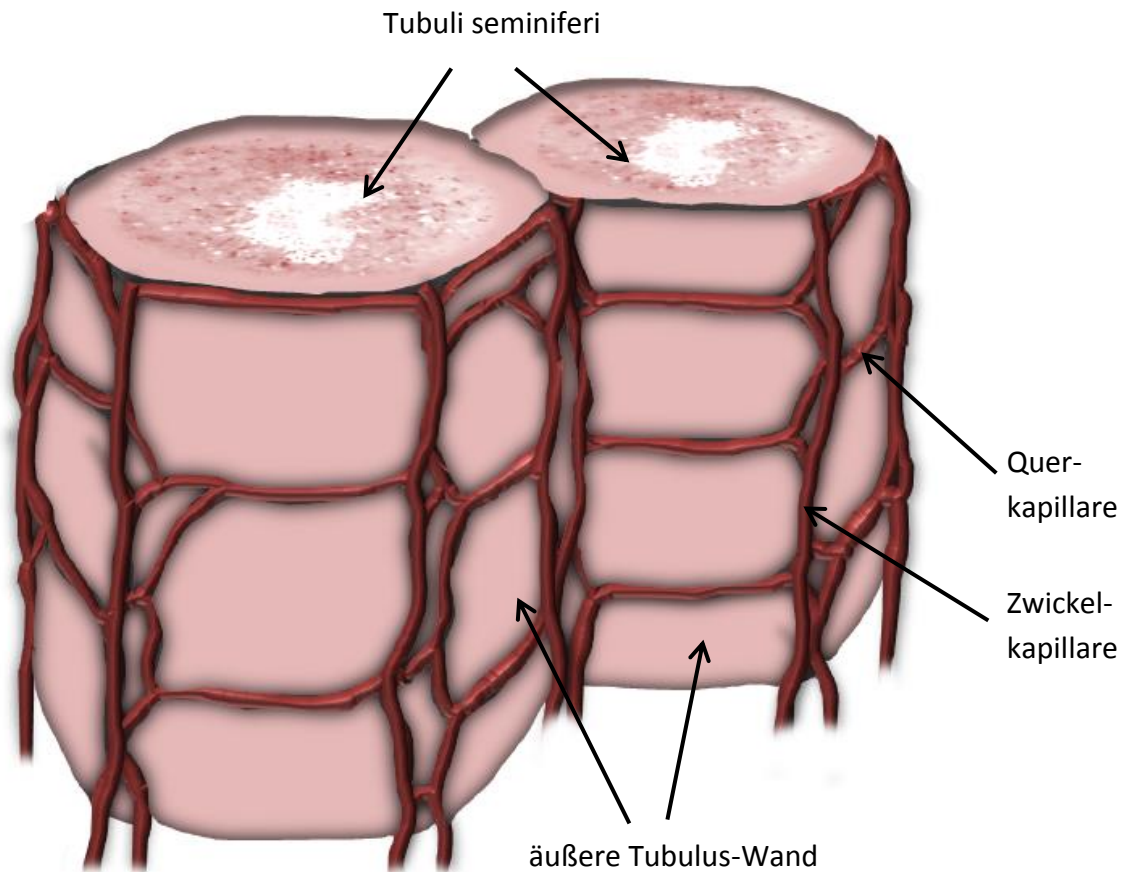


**Abb. 18: Aufteilung der kapillaren Gefäßstrecke (Hoden Mensch)**

Die kapillare Gefäßstrecke lässt sich unterteilen in Inter-Leydig-Zell-Kapillaren der arteriellen und der venösen Seite und den dazwischenliegenden Intramuralkapillaren in der Tubuluswand.

(Abbildung modifiziert nach Holstein in Benninghoff & Drenckhahn 2008)

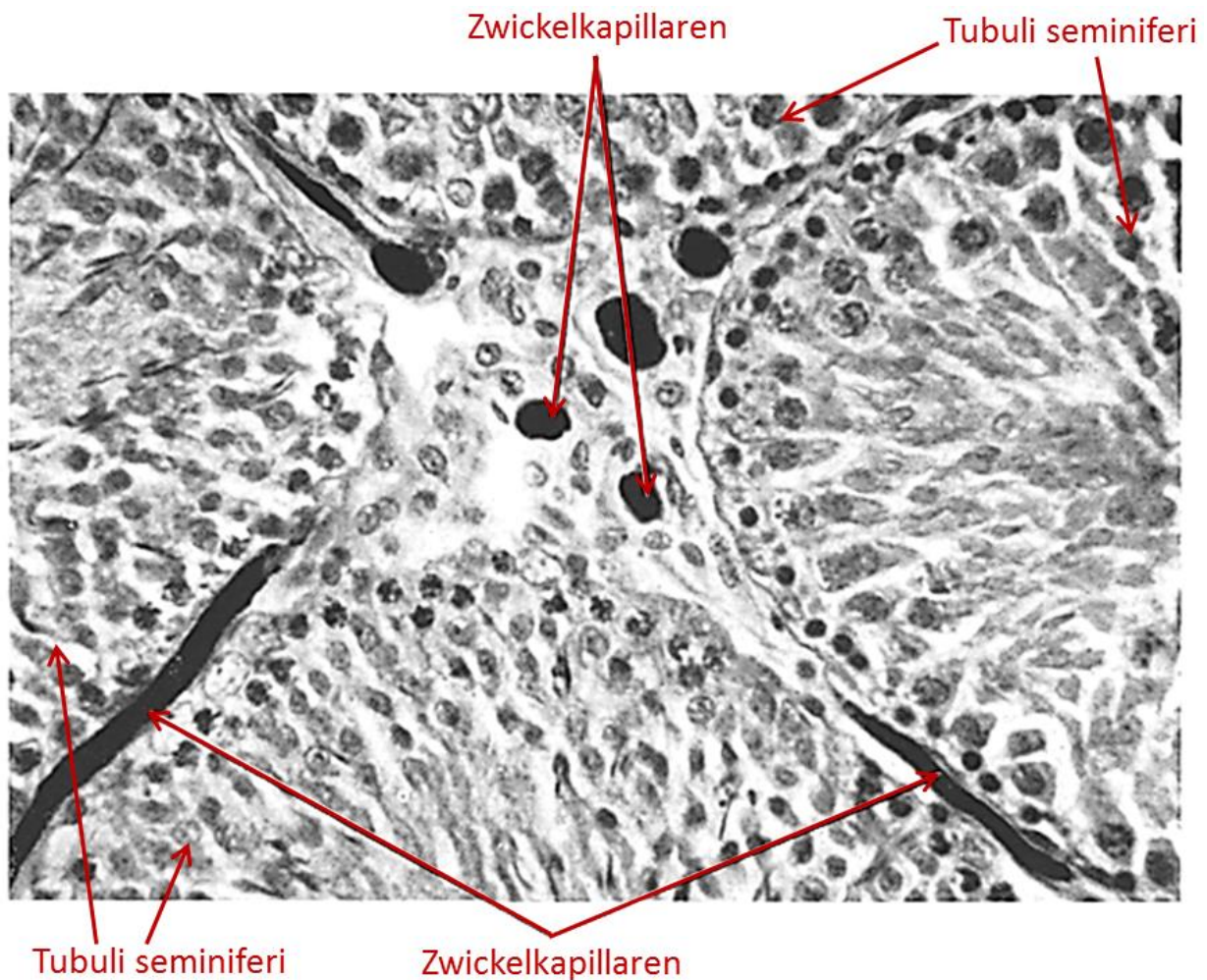
Die Kapillaren im Maushoden sind zum interstitiellen Gewebe hin abgegrenzt. Sie formen zwei Netzwerke – das eine läuft parallel zu den Hodentubuli, das andere um die Hodentubuli herum in einem Strickleiter-ähnlichen Gefüge (Müller 1957, Suzuki 1982, Murakami et al. 1989) (Abb. 19, 20, 21, 22, 23).



**Abb. 19: Räumliche Anordnung des Kapillarnetzes und seiner Beziehung zur Tubuluswand**

Die Kapillaren im Rattenhoden verlaufen in einem Strickleiter-ähnlichen Gefüge um die Hodentubuli herum.

(Abbildung modifiziert nach Müller 1957)

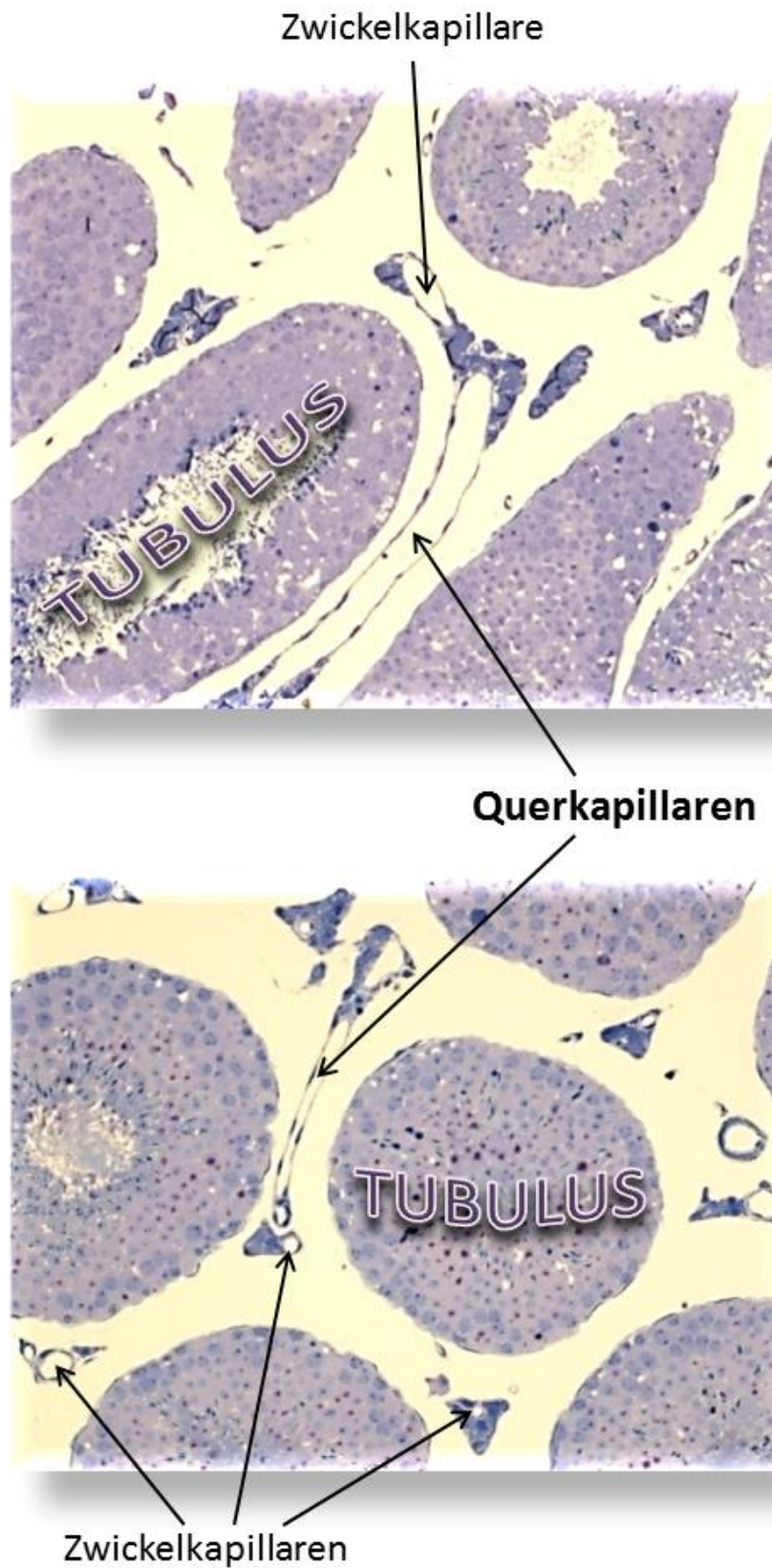


**Abb. 20: Querschnitt durch das Hodengewebe**

Die Abbildung zeigt einen Querschnitt durch das Hodengewebe (Ratte) und das Strickleiterprinzip des Kapillarsystems. Zu sehen ist der Anschnitt von vier Hodentubuli und das dazwischenliegende Interstitium, in dem die Querschnitte der Zwickelkapillaren lokalisiert sind. Zwischen den Wänden der aneinander angrenzenden Tubuli sind Längsschnitte der Querkapillaren zu erkennen. (Vergrößerung: Ok.8, Obj.40)

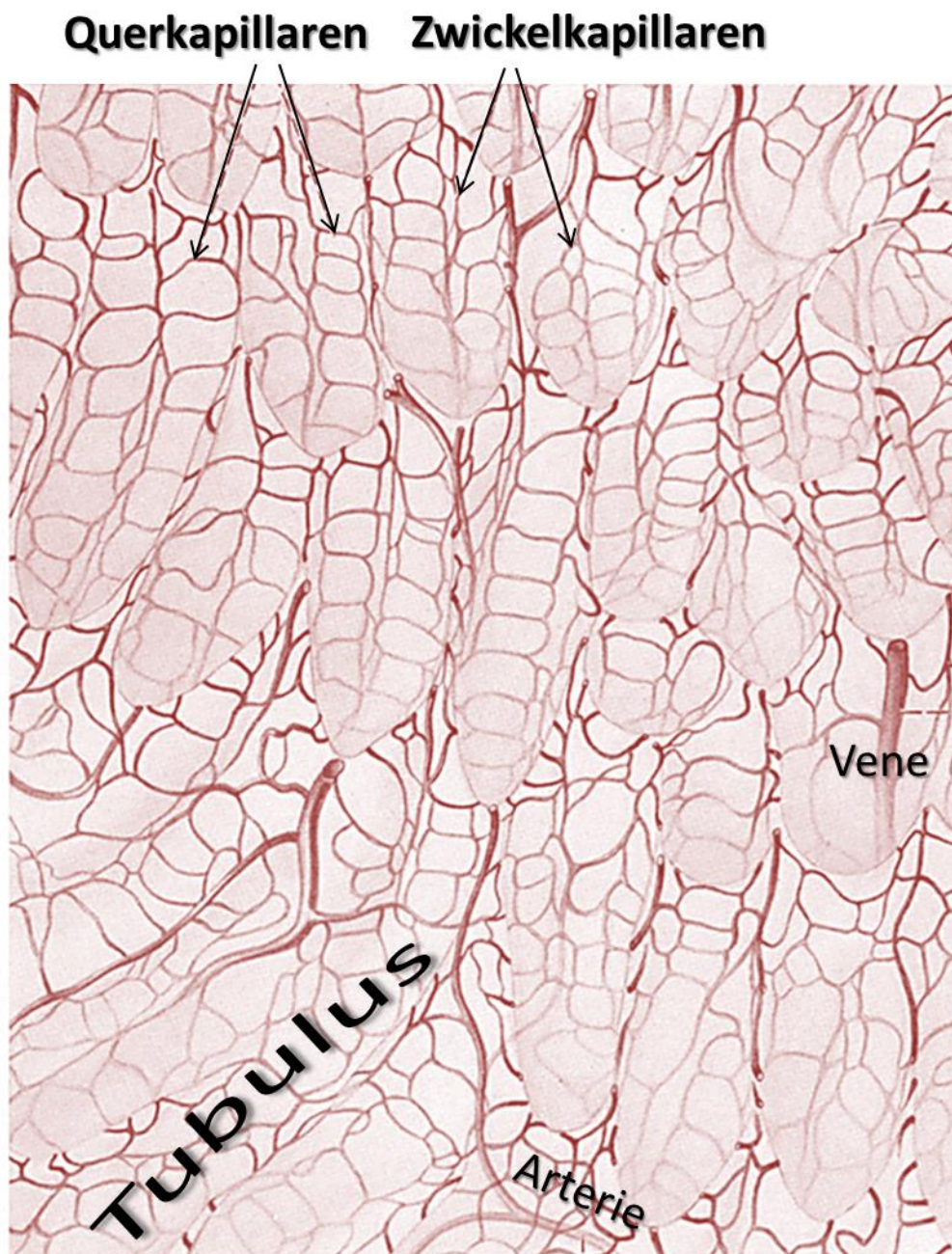
(Abbildung modifiziert nach Müller 1957)





**Abb. 21: Querschnitt durch das Hodengewebe (Maus)**

Die Abbildung zeigt den histologischen Schnitt von Hodentubuli mit dem Kapillarsystem inklusive Zwickel- und Querkapillaren. (Vergrößerung: Ok.10, Obj.20)

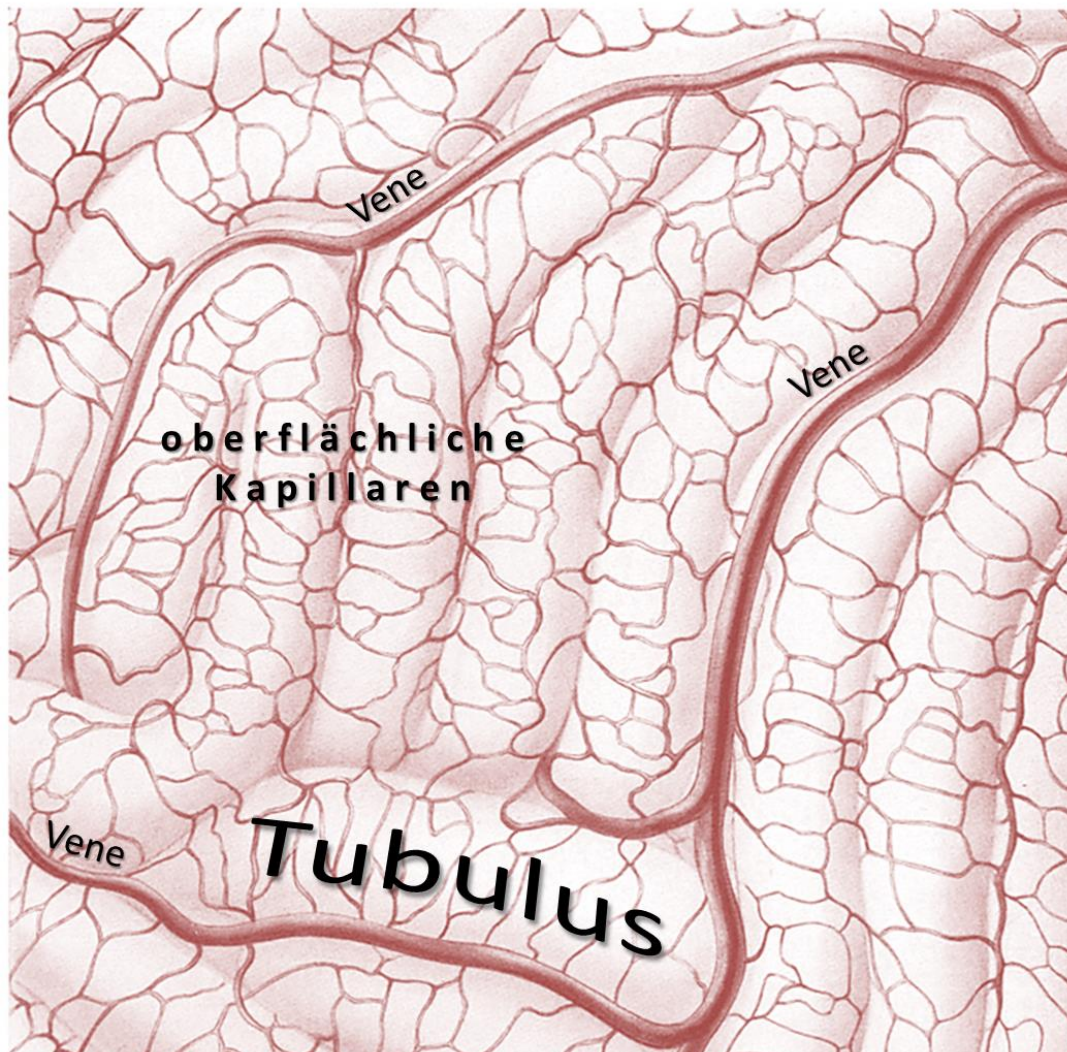


**Abb. 22: Kapillarnetz innerhalb des Hodengewebes (Ratte)**

Die Abbildung zeigt die räumliche Strickleiter-ähnliche Anordnung des Kapillarnetzes innerhalb des Hodenparenchyms bei Schnitt durch die Hodentubuli.

(Abbildung modifiziert nach Müller 1957)





**Abb. 23: Kapillarnetz an der Hodenoberfläche (Ratte)**

Die Abbildung zeigt die räumliche Strickleiter-ähnliche Anordnung des Kapillarnetzes an der Oberfläche des Hodenparenchyms.

(Abbildung modifiziert nach Müller 1957)

## 1.2 Altern und Hoden

Die Auswirkungen des Alterns auf den Hoden können mit einem Abfall der Androgenspiegel und Veränderungen der testikulären Morphologie einhergehen (Sartorius & Nieschlag 2010). Diese testikulären Veränderungen sind assoziiert mit strukturellen und funktionellen Störungen von Sertolizellen und den Testosteron-produzierenden Leydigzellen (Weidner et al. 2002, Sartorius & Nieschlag 2010). Bezüglich der Morphologie der Hodentubuli wurden degenerative Veränderungen der Keimzellen in Verbindung mit einer Reduzierung des Tubulusepithels bis hin zur Fibrose beschrieben. Derart gestörte Tubuli sind jedoch nicht in den Hoden aller alter Männer aufzufinden (Weidner et al. 2002, Sartorius & Nieschlag 2010). Unzureichende Vaskularisierung wurde in diesem Zusammenhang bereits diskutiert (Kühnert & Nieschlag 2004).

Über das Auftreten von Arealen mit tubulärer Sklerose und arteriosklerotischen Plaques in interstitiellen Hodengefäßen des Menschen ist berichtet worden (Holstein et al. 1989). Arteriosklerotische Plaques können durch Entzündung und Lipidansammlung entstehen (Salama et al. 2013) und haben einen negativen Effekt auf die Blutzirkulation. In sehr frühen Untersuchungen retinierter Hoden bei Männern wurde reduzierte Blutperfusion beschrieben, durch die es zur Hodenatrophie und -hypoplasie kam (Staemmler 1923).

Altern potenziert vorexistierende arteriosklerotische Veränderungen (Barac & Panza 2009), was in Zusammenhang mit oxidativem Stress gesehen wird (Pansarasa et al. 1999, Dröge 2005), der mit ansteigendem Alter zunimmt und sich begünstigend auf die Entstehung vaskulärer Erkrankungen auswirkt. Arteriosklerotische Veränderungen wiederum wirken sich negativ auf das Serumtestosteron aus (Jones et al. 2005, Svarthberg et al. 2006).

Reduzierte Durchblutung wurde bereits in früheren Studien als mögliche Ursache für degenerative Veränderungen von Keimzellen und Oligospermie beim Menschen in Betracht gezogen (Nasah & Cox 1978) und es wurde von mikrovaskulären Veränderungen in Verbindung mit altersabhängigen Spermatogenesestörungen (Sasano & Ichijo 1969, Suoranta 1971, Ergün et al. 1994) und im Zusammenhang mit der Leydigzellfunktion (Ergün et al. 1994) berichtet. Studien mit männlichen Mäusen haben gezeigt, dass Altern alleine zwar negative Auswirkungen auf Spermatogenese und Spermienzahl haben kann (Gosden et al. 1982), auf die Wurfgröße jedoch keinen Einfluss hat (Finn 1964).



In einer früheren Arbeit unserer Gruppe (*Langheinrich et al. 2012*) wurde für alte Mäuse eines Arteriosklerose-Modelles (ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Maus) bei gleichzeitiger fett- und kohlenhydratreicher Diät Veränderungen der Spermatogenese erwähnt.

Somit ist es von entscheidender Bedeutung, die Morphologie der testikulären Gefäße und Mikrogefäße mit Hinblick auf einen Zusammenhang von Durchblutungsstörungen und Infertilität zu untersuchen und in Beziehung zu altersbedingten und hormonellen Faktoren zu setzen.

### **1.3 Arteriosklerose**

Arteriosklerose ist eine systemische Gefäßerkrankung, die eine der häufigsten Todesursachen und die Hauptursache für Herzinfarkte und Schlaganfälle in der westlichen Welt darstellt und deren Auftreten weltweit ansteigend ist (*Ross 1993, Bui et al. 2009, Jaipersad et al. 2014*).

Der komplexe Entstehungsprozess der Arteriosklerose ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt, es handelt sich aber um ein multifaktorielles Geschehen, dessen verschiedene Theorien nachfolgend beschrieben werden.

#### **1.3.1 Entstehungsmechanismen**

Der Arteriosklerose liegt ein inflammatorischer Prozess zugrunde, der durch die Entwicklung lipidreicher Plaques innerhalb der Arterienwand charakterisiert ist (*Jaipersad et al. 2014*). Diese Plaques entstehen durch die Ansammlung oxidierten Low-density-Lipoproteine (LDL) in der Gefäßwand. Die Ansammlung dieser oxidierten LDLs wird durch zahlreiche Risikofaktoren begünstigt. Diese Faktoren sind z.B. Hypercholesterinämie, Hyperhomocysteinämie, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus, sowie genetische Prädisposition, Übergewicht, Nikotinkonsum, Alter und männliches Geschlecht (*Ross 1999, Bui et al. 2009, Runge et al. 2010*).

In allen Industrieländern tritt das Vorkommen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei Männern früher und ausgeprägter auf als bei Frauen (*Liu et al. 2003, Wu & von Eckardstein 2003, Kaushik et al. 2010, Perusquía & Stallone 2010, Schwarcz & Frishman 2010*).

Einer der wichtigsten Faktoren, die an der Pathophysiologie von Gefäßkrankheiten wie Arteriosklerose mitwirken, ist „Oxidativer Stress“ und eine Anhäufung von reaktiven Oxygen-Spezies (ROS), wie z.B.  $O_2^-$ . Ansteigende Konzentrationen von ROS münden u.a. in einer Erhöhung der Oxidation von Low-density-Lipoproteinen (oxLDL) und vaskulärer Dysfunktion (*Witztum 1994, Zhou et al. 1998*). Zusätzlich agieren ROS als intrazelluläre Botenstoffe, deren Anhäufung proinflammatorische Signalwege mit ansteigender Neigung zur Entstehung arteriosklerotischer Plaques innerhalb der Gefäßwand bewirkt. Oxidativer Stress und oxidative Signalwirkung stellen eine Verbindung zwischen vielen Risikofaktoren für Arteriosklerose dar (*Runge et al. 2010*).

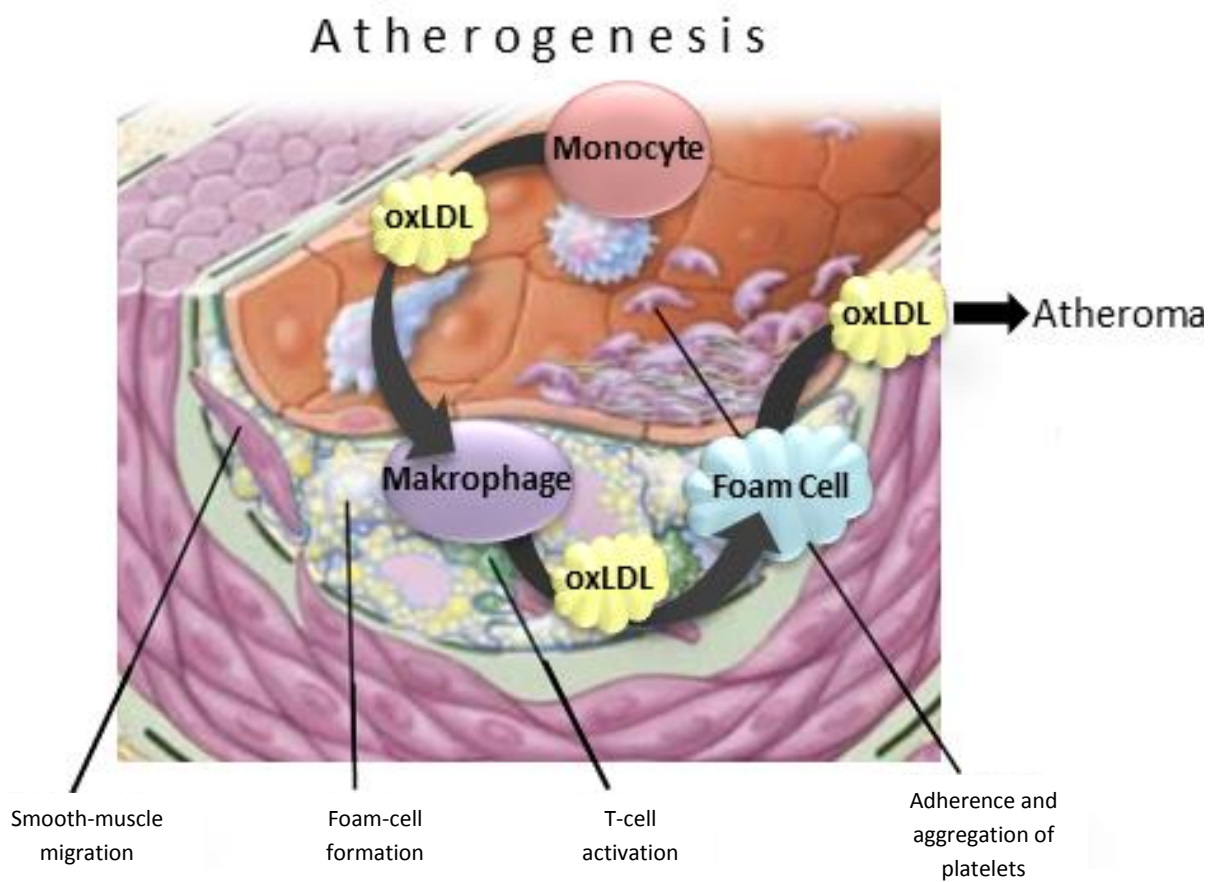
Mit zunehmendem Alter steigt auch der oxidative Stress an (*Pansarasa et al. 1999, Dröge 2005*), was begünstigend auf die Entstehung vaskulärer Erkrankungen wie Arteriosklerose wirkt.

Die Akkumulation und Oxidation von Low-density-Lipoproteinen (LDL) innerhalb der Arterienwand löst eine komplexe Serie von biochemischen und inflammatorischen / immunomodulatorischen Reaktionen aus, bei denen multiple Zelltypen involviert sind, die ultimativ maßgeblich für die Entwicklung instabiler arteriosklerotischer Plaques beteiligt sind (*Kaplan & Aviram 1999, Bui et al. 2009*).

#### **1.3.1.1 Monozyten / Makrophagen**

Dabei induziert das oxidierte LDL (oxLDL) das Eindringen von Monozyten aus dem Blutstrom in die Arterienwand durch die Endothelzellen hindurch. Die Monozyten werden anschließend zu Makrophagen und später – nach Aufnahme von oxLDL – zu sogenannten Schaumzellen (Abb. 24), die den ersten Schritt in der Entwicklung der arteriosklerotischen Plaques darstellen (*Kaplan & Aviram 1999*).

Ebenfalls begünstigend auf die Arteriosklerose wirkt sich chronisches vaskuläres Entzündungsgeschehen aus, das durch Cholesterol-Kristalle mittels des Proteinkomplexes (Inflammasom) mit IL-1 ausgelöst wird. Somit besteht eine Verbindung zwischen Cholesterol-Stoffwechsel und Prozessen, die der Arteriosklerose vorausgehen (*Donath et al. 2013*).



**Abb. 24: Einfluss des oxLDLs auf den Pathomechanismus der Arteriosklerose**

OxLDL induziert das Eindringen von Monozyten aus dem Blut in die Arterienwand. Diese werden zu Makrophagen und nach Aufnahme von oxLDL zu Schaumzellen differenziert, die die Vorstufe von arteriosklerotischen Plaques darstellen.

(Abbildung modifiziert nach Ross 1999)

### 1.3.1.2 Endotheliale Dysfunktion

Der Entstehung der Arteriosklerose gehen auch endotheliale Veränderungen voraus (Abb. 25 A), wie z.B. eine erhöhte endotheliale Permeabilität für Lipoproteine und andere Plasmabestandteile, was durch Stickstoffmonoxid, Prostaglandine, Plättchen-Wachstumsfaktor (platelet derived growth factor, PDGF), Angiotensin II und Endotheline vermittelt wird (Ross 1999). Es kommt zur vermehrten Expression von ELAM (endothelium leukocyte adhesion molecules), einschließlich L-Selectin und PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1), und von Endotheladhäsionsmolekülen, einschließlich E-Selektin, P-Selektin, ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1). Des Weiteren kommt es zur Einwanderung von Leukozyten in die Arterienwand, was vermittelt wird durch oxLDL, MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1), Interleukin-8, Plättchen-Wachstumsfaktor, M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) und Osteopontin (Ross 1999).

### 1.3.1.3 Ausbildung von Fettstreifen

In der Weiterentwicklung der Arteriosklerose kommt es zur Ausbildung von Fettstreifen (sogenannten „fatty streaks“) (Ross 1999) (Abb. 25 B). Diese bestehen anfangs aus Lipid-beladenen Monozyten und Makrophagen (Schaumzellen) sowie T-Lymphozyten, später fügen sich eine Vielzahl glatter Muskelzellen (smooth-muscle cells) aneinander. Die Migration glatter Muskelzellen wird durch PDGF, Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF2, fibroblast grow factor 2) und den transformierenden Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF $\beta$ , transforming grow factor  $\beta$ ) stimuliert. Die weiteren Schritte des Prozesses beinhalten T-Zell-Aktivierung, Schaumzellbildung und die Anhaftung und Anhäufung von Plättchen. Dabei wird die T-Zell-Aktivierung durch Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , Interleukin-2 und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor vermittelt, die Schaumzellbildung durch oxLDL, Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor, Tumornekrosefaktor  $\alpha$  und Interleukin-1. Die Anhaftung und Anhäufung von Plättchen wird stimuliert durch Integrine, P-Selektin, Fibrin, Thromboxan A<sub>2</sub>, Gewebefaktor und die in Abb. 1 beschriebenen Faktoren, die für die Anhaftung und Migration von Leukozyten verantwortlich sind (Ross 1999).

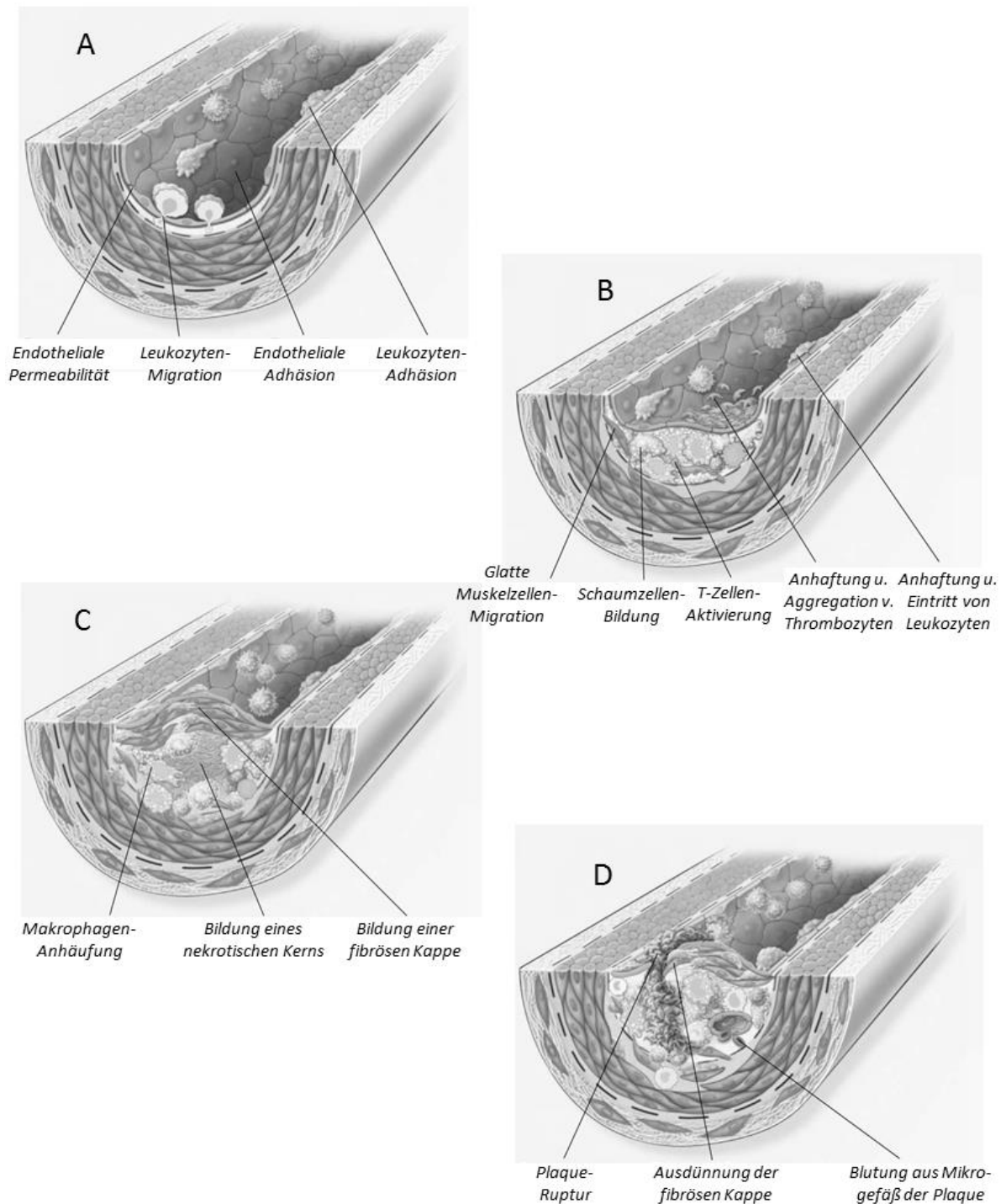
#### **1.3.1.4 Fortschreiten der Läsionen**

Das Voranschreiten der Arteriosklerose ist charakterisiert durch die Erweiterung der Läsionen (Ross 1999) (Abb. 25 C). Dazu bilden die im oberen Abschnitt beschriebenen Fettstreifen eine fibröse Kappe, die die Läsion vom Lumen abgrenzt. Diese fibröse Kappe beinhaltet ein Gemisch aus Leukozyten, Lipiden und Ablagerungen, die einen nekrotischen Kern bilden. Durch weitere Anhaftung und Migration von Leukozyten weiten sich diese Läsionen von ihrem Ansatz her aus. Die Leukozyten-Reaktion wird durch die oben genannten Faktoren ausgelöst, wobei die hauptsächlichen Faktoren mit Makrophagen-Anhäufung einschließlich M-CSF, MCP-1 und oxLDL zusammenhängen. Der nekrotische Kern ist das Ergebnis aus Apoptose und Nekrose, erhöhter proteolytischer Aktivität und Anreicherung von Lipiden. Die fibröse Kappe bildet sich als Folge erhöhter Aktivität von PDGF, TGF $\beta$ , Interleukin-1, Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , und Osteopontin und erniedrigtem Abbau von Bindegewebe (Ross 1999).

#### **1.3.1.5 Fibröse Plaques und Plaque-Ruptur**

Ruptur der fibrösen Kappe (Abb. 25 D) oder Geschwürbildung der fibrösen Plaque kann schnell zu Thrombose führen und entsteht meistens an verdünnten Stellen der fibrösen Kappe, die die fortgeschrittene Läsion abdeckt (Ross 1999). Zur Ausdünnung der fibrösen Kappe kommt es offenbar aufgrund des kontinuierlichen Zustroms und der Aktivierung von Makrophagen, die Metalloproteasen und andere Enzyme freisetzen. Diese Enzyme bewirken einen Abbau der Matrix, was zu Blutungen aus den Vasa vasorum oder aus dem Lumen der Arterie führen und in Thrombenbildung und Arterienverschluss resultieren kann (Ross 1999).

## Mechanismen der Arteriosklerose



**Abb. 25: Pathomechanismen der Arteriosklerose**

*Endotheliale Dysfunktion (A), Ausbildung von Fettstreifen (B), Fortschreiten der Läsionen (C), Fibröse Plaques und Plaques-Ruptur (D).*

*(Abbildung übernommen und modifiziert von Ross 1999)*

### 1.3.2 Veränderungen in kapillaren Gefäßen bei Mikrozirkulationsstörungen

Es ist bekannt, dass bestimmte Stoffwechselerkrankungen Auswirkungen auf die Struktur und Funktion der Mikrozirkulation haben, wie z.B. auf die der Netzhaut (Retina). Diese mikrovaskulären Veränderungen sind verbunden mit Typ-1- und Typ-2-Diabetes und Bluthochdruck (Hypertonie), den Komponenten des metabolischen Syndroms (z.B. Adipositas, Fettstoffwechselstörung) und anderen Makro- und Mikro-Gefäßerkrankungen (z.B. Schlaganfall, Herz-Kreislaufsterblichkeit). Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass endotheliale Dysfunktionen und Entzündungen als mögliche Mechanismen bei der Entwicklung verschiedener retinaler mikrovaskulärer Veränderungen bei Patienten mit oben genannten Erkrankungen und Stoffwechselstörungen beteiligt sind (*Nguyen & Wong 2006*).

Bei diesen retinalen Mikrozirkulationsstörungen zeigen sich Venenverschlüsse (*Wong et al. 2004*), Arterienverschlüsse (z.B. durch Embolien), Mikroaneurysmen und Blutungen (*Nguyen & Wong 2006*). Es besteht hierbei ein Zusammenhang zwischen Fettstoffwechselstörungen, wie erhöhtem Triglycerid- (*Wong et al. 2004*) und Cholesterol-Level (*Ikram et al. 2004*), und venolärer Dilatation. Außerdem können niedrige HDL-Cholesterinlevel arteriovenösem „Nicking“ zugeordnet werden. Arteriovenöses Nicking stellt eine Verengung der Vene in einer Arterien-Venen-Kreuzung dar. Auch Adipositas steht damit in Verbindung, außerdem kann Adipositas Arteriolen-Verengung und Venolen-Erweiterung zugeordnet werden (*Wong et al. 2004*). Bluthochdruck (Hypertonie) wird neben arteriovenösem Nicking mit fokalen Verengungen der Arteriolen (Stenosen) in Verbindung gebracht (*Ikram et al. 2004, Wong et al. 2004*).

Die retinalen Gefäßmanifestationen bei Diabetes, Bluthochdruck und anderen Stoffwechselerkrankungen könnten teilweise Prozesse reflektieren, die mit Entzündungen und endothelialer Dysfunktion assoziiert sind. Entzündungen und endotheliale Dysfunktion werden in diesem Zusammenhang als Schlüsselmechanismen diskutiert, die zur Entwicklung von Diabetes und den daraus resultierenden Gefäßkomplikationen beigetragen haben könnten (*Ikram et al. 2004, Nguyen & Wong 2006*).

Auch die Architektur der retinalen Mikrogefäße ist von diesen Veränderungen betroffen. So wird z.B. Bluthochdruck mit einer Erhöhung des Verhältnisses der Gefäßlänge zum Gefäßdurchmesser der Arteriolen assoziiert (*Hughes et al. 2006*). Die Venolen weisen eine erhöhte Gewundenheit ihrer Gestalt auf (*Hughes et al. 2006, Nguyen et al. 2007*) und die Arteriolen reduzierte Verzweigungswinkel an arteriolen Gabelungen (*Stanton et al. 1995, Nguyen et al. 2007*). Des Weiteren wird von einer reduzierten mikrovaskulären Dichte berichtet (*Stanton et al. 1995, Kutschbach et al. 1998, Hughes et al. 2006*).

Diese die Mikrovaskulatur betreffenden Befunde sollten in der vorliegenden Arbeit im Hoden näher betrachtet werden, um einen Zusammenhang zwischen Arteriosklerose bzw. gestörter Perfusion und ungeklärter Infertilität im Hinblick auf Spermatogenesestörungen zu untersuchen.

#### 1.4 Arteriosklerose und Spermatogenese – das Mausmodell

Die ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Maus stellt ein etabliertes Modell für die Arterioskleroseforschung dar (Breslow 1996). Durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen werden die Gene für das Apolipoprotein E (ApoE) und für den Low Density Lipoprotein Rezeptor (LDL-Rezeptor) ausgeschaltet (Plump et al. 1992). Das ApoE hat die Funktion, den Stoffwechsel von Lipoprotein-Partikeln zu vermitteln, wozu es an den LDL-Rezeptor bindet. Des Weiteren besitzt es zusätzlich auch entzündungshemmende Eigenschaften, wodurch es – unabhängig von seiner Rolle im Lipidstoffwechsel – zum Schutz vor Arteriosklerose beitragen kann (Ali et al. 2005). Durch diesen Gen-Doppelknockout bildet die ApoE-Maus bereits im Alter von wenigen Wochen arteriosklerotische Veränderungen in der Gefäßwand aus (Plump et al. 1992, Zhang et al. 1992, Ishibashi et al. 1994a, Jawień et al. 2004), die sich zu arteriosklerotischen Plaques weiterentwickeln und damit die typischen Charakteristika von humanen arteriosklerotischen Läsionen aufweisen (Nakashima et al. 1994, Qiao et al. 1994, Reddick et al. 1994, Seo et al. 1997). Dieser Effekt kann durch cholesterin- oder fettreiche Ernährung (z.B. Western-Diät) beschleunigt und in seiner Ausprägung intensiviert werden (Plump et al. 1992, Zhang et al. 1992, Breslow 1996).

Untersuchungen zu Störungen der Gefäßversorgung in Zusammenhang mit Arteriosklerose bei ApoE- und ApoE/LDL-Rezeptor defizienten Mäusen wurden zuvor in Lunge (Langheinrich et al. 2004a,b), Herz (Ishibashi et al. 1994b, Langheinrich et al. 2004b), Aorta (Ishibashi et al. 1994b, Jawień et al. 2004, Langheinrich et al. 2006, 2007a,b, Gaudreault et al. 2013), Niere (Langheinrich et al. 2010) und Blase (Bschleipfer et al. 2014) durchgeführt.

Kürzlich wurde in einem Mausmodell der Zusammenhang zwischen Gefäßversorgung und Spermatogenese systemisch untersucht (Langheinrich et al. 2012). Für diese Studie wurden ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Mäuse als Tiermodell verwendet, die altersbedingte vaskuläre Läsionen (Langheinrich et al. 2006, 2010) und nachfolgende Veränderungen der Hoden aufweisen. Diese systemischen vaskulären Veränderungen, die mit Hypercholesterinämie einhergehen (Magoori et al. 2003, Langheinrich et al. 2006)



werden durch Dysfunktion zweier wichtiger Moleküle verursacht (*Ishibashi et al. 1994a*). Diese arteriosklerotischen Läsionen weisen strukturell deutliche Ähnlichkeiten mit denen der humanen Arteriosklerose auf (*Langheinrich et al. 2006, 2010*).

Unter Verwendung dieses Tiermodells fanden wir in unserer vorherigen Studie heraus, dass sehr alte ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Mäuse ein reduziertes Hodenvolumen, ein reduziertes Hodengefäßvolumen, gemischte testikuläre Atrophie der Tubuli seminiferi, reduzierte Spermienanzahl, sowie einen Anstieg von Hypoxie- und Entzündungsmarkern aufweisen (*Langheinrich et al. 2012*). Die arteriosklerotischen Läsionen in diesem Mausmodell nehmen Einfluss auf die Endstrombahnen arterieller Perfusion (*Langheinrich et al. 2006, 2007a,b, 2010*). Dennoch ist die Mikrozirkulation im Hoden bisher nie im Detail untersucht worden.

Testikuläre Kapillaren spielen eine bedeutende und reguläre Rolle für die männliche Fertilität. Sie sind essentiell für die Blutversorgung der Hodentubuli und interessanterweise scheint eine vaskulär-assoziierte Nische für eine intakte Spermatogenese unerlässlich zu sein. So wurde in Mäusen die Nähe undifferenzierter Spermatogonien A zu den umgebenen peritubulären Kapillaren bestimmt (*Yoshida et al. 2007*).

Arteriosklerotische Veränderungen haben einen negativen Effekt auf Serumtestosteron (*Jones et al. 2005, Svarthberg et al. 2006*). Reduzierte Testosteron-Serumlevel sind ebenfalls im ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Mausmodell beschrieben worden (*Langheinrich et al. 2012*).

## **2 FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT**

Durch vorangegangene Forschungsergebnisse – Alter und mangelnde testikuläre Perfusion resultieren in sinkende Testosteronserumleveln – stellt sich die Frage, in wie weit Arteriosklerose bzw. systemische Durchblutungsstörungen als mögliche Ursache ungeklärter Infertilität in Betracht gezogen werden kann.

Um möglichen Hinweisen auf einen Zusammenhang zwischen arteriosklerotischen Läsionen, eingeschränkter Hodenperfusion und Fertilitätsstörungen nachzugehen, wurde in der vorliegenden Studie die Mikroperfusion der Hoden im ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Mausmodell zusammen mit differenzierten hormonellen Parametern untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist das Erlangen weiterer Erkenntnisse über die Auswirkungen von Arteriosklerose und testikulärer Minderperfusion im Hinblick auf die daraus resultierenden Fertilitätsstörungen.

### 3 VERSUCHSAUFBAU

Vor Erläuterung der experimentellen Methoden (MikroCT, Stereologie, GC-MS) im Detail, soll kurz der gesamte Versuchsaufbau der Studie dargestellt werden (Abb. 26). Der Fokus dieser Arbeit liegt in der Untersuchung der Perfusion und Mikroperfusion des Hodens. Dazu wurden die Hoden von ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Mäusen als Arteriosklerose-Modell im Alter von 20, 40, 60 und 87 Wochen und Hoden von C57BL6/J-Mäusen als Kontrolltiere im gleichen Alter verwendet. Von jeder Altersgruppe wurden die Hoden von bis zu zehn ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Mäusen und zehn C57BL6/J-Mäusen entnommen und die Gefäße mikrocomputer-tomographisch und histologisch untersucht. Für die (histologische) Untersuchung der Mikrozirkulation standen Veränderungen im höheren Alter im Fokus, so dass hier 40, 60 und 87 Wochen alte Mäuse untersucht wurden. Außerdem wurden von jedem Tier bis zu 1000 µl Blut entnommen und der jeweilige Serumtestosteron-Level gemessen. Vor Entnahme der Hoden wurden die zuvor euthanasierten Tiere systemisch perfundiert. Ergänzend zu diesen Untersuchungen wurden die Wurfgrößen von Zuchttieren beider Mauslinien ausgewertet und miteinander verglichen.

**Abb.26: Versuchsaufbau – Kurzbeschreibung des gesamten Ablaufs von der Präparation des Tierkörpers, über die Probenentnahme bis zur Zuordnung des Probenmaterials zu den einzelnen Untersuchungsmethoden.**

*Das VOR der ersten Perfusion entnommene Blut aus der V. cava caudalis wurde für die Steroidmessung mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) verwendet.*

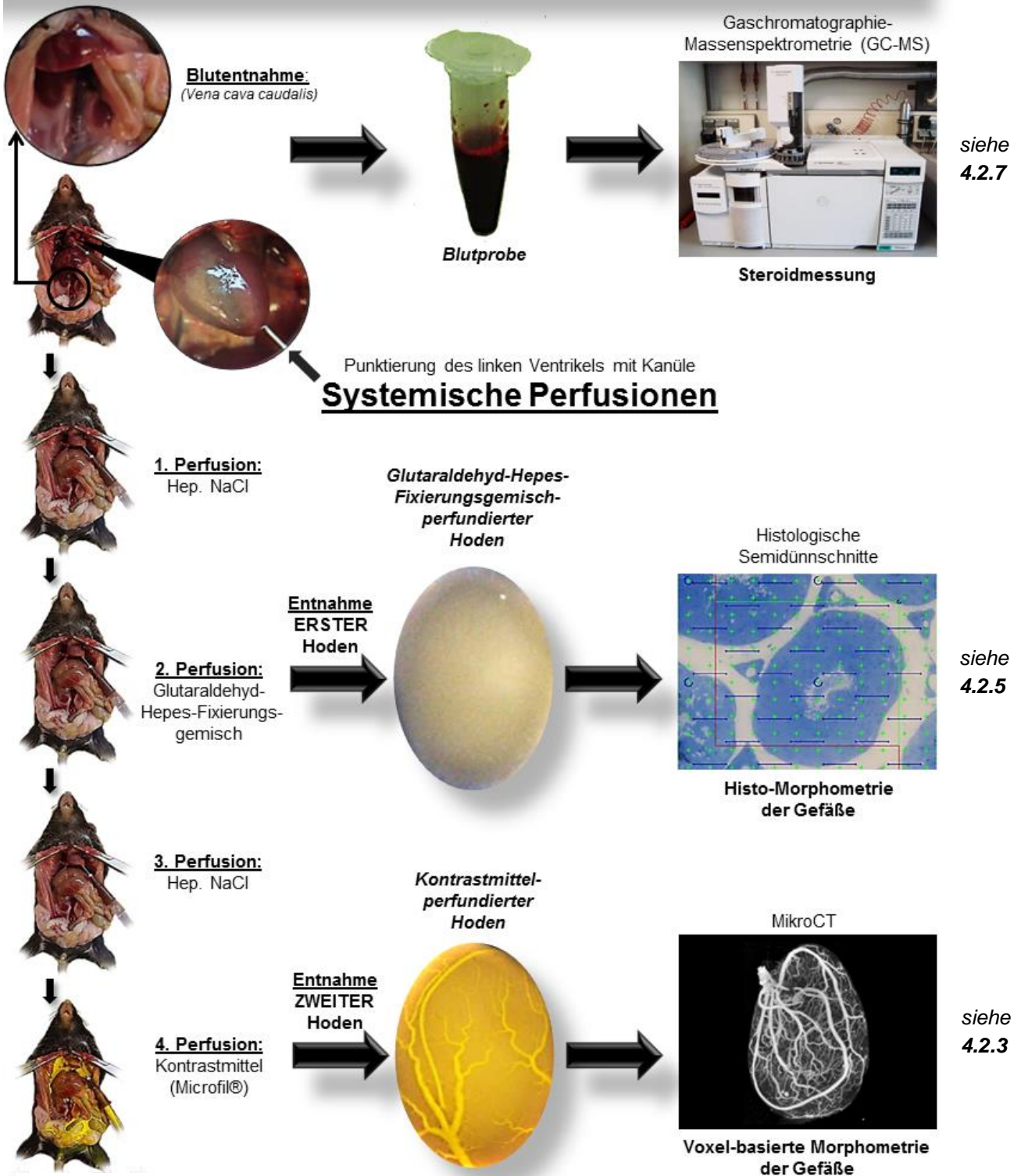
*Nach systemischer NaCl- und Glutaraldehyd-Hepes-Fixierungsgemisch-Perfusion wurde der erste Hoden entnommen für die Untersuchung der Histo-Morphometrie der Gefäße an histologischen Semidünnschnitten.*

*Nach anschließender NaCl- und Kontrastmittel(Microfil®)-Perfusion wurde der zweite Hoden entnommen für die Untersuchung der Voxel-basierten Gefäßmorphometrie im MikroCT.*

*(Abbildung siehe Seite 38)*

V E R S U C H S A U F B A U

Präparation → Probenmaterial → Untersuchung



(Abb. 26 -> Beschreibung siehe Seite 37)

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Versuchstiere

ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Rezeptor-  
Doppelknockout-Maus  
(B6.129-Apoe<sup>tm1Unc1</sup>Ldlr<sup>tm1Her</sup>/J)

Züchtung von Prof. Langheinrich und  
Dr. Kampschulte, Radiologie /  
Experimentelle Radiologie,  
Justus-Liebig-Universität Gießen

C57BL6/J-Maus

Charles River, Sulzbach, Deutschland

#### 4.1.2 Untersuchungsmaterial

Blut

Versuchstiere (s.o.)

Hoden

Versuchstiere (s.o.)

#### 4.1.3 Chemikalien und Verbrauchsstoffe

##### 4.1.3.1 Für die Maus-Perfusion

Glutaraldehyd

Merck, Darmstadt, DE

Heparin-Natrium-5000-ratiopharm®

Ratiopharm GmbH, Ulm, DE

Hepes

Merck, Darmstadt, DE

Isotone Kochsalz-Lösung 0,9%

Braun, Melsungen, DE

Microfil®

FLOW TECH, INC., Carver,  
Massachusetts, USA

Paraformaldehyd

Merck, Darmstadt, DE

**4.1.3.2 Für die Hoden-Einbettung**

Chlorwasserstoff (HCL)	Merck, Darmstadt, DE
Epon (Agar 100 Resin Kit)	Agar Scientific, Stansted Essex, UK
Ethanol	Riedel-de Haën, Seelze, DE
Hepes Sodium Salt	Calbiochem, Merck, Darmstadt, DE
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, DE
Osmiumsäure (OsO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Propylenoxid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Uranylacetatlösung	Merck, Darmstadt, DE

**4.1.3.3 Für die Herstellung der Semidünnschnitte**

Methylenblau	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
Tri-Kalium-Phosphat	Merck, Darmstadt, DE

**4.1.3.4 Für die Steroidmessung**

17,21-Dihydroxy-pregna- 1,4-diene-3,20-dione	Paesel & Lorei, Hanau, DE
Aceton	Merck / Sigma-Aldrich, DE
Acetonitril	Merck / Sigma-Aldrich, DE
Acetonitril	Merck, Darmstadt, DE
Chloroform	Merck / Sigma-Aldrich, DE
Cyclohexan	Merck / Sigma-Aldrich, DE
Deuterium-Gas	Merck / Sigma-Aldrich, DE
Dichloromethan	Merck / Sigma-Aldrich, DE



Ethanol	Merck / Sigma-Aldrich, DE
Ethylacetat	Merck / Sigma-Aldrich, DE
H <sub>2</sub> O	(Fluka) Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Helium	Merck / Sigma-Aldrich, DE
Heptafluorobutyric Anhydrid (HFBA)	(Fluka) Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Kochsalzlösung	Merck / Sigma-Aldrich, DE
Methanol	Merck, Darmstadt, DE
Nitrogen	Merck / Sigma-Aldrich, DE
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck / Sigma-Aldrich, DE
Silica-Gel (Kieselgel 60)	(Fluka) Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Tetramethylsilan	Merck / Sigma-Aldrich, DE
Tris(triphenylphosphin)rhodium(I) Chlorid	Merck / Sigma-Aldrich, DE
Vanillin	Merck / Sigma-Aldrich, DE

#### **4.1.4 Geräte**

##### **4.1.4.1 Für die Präparation und Perfusion des Tierkörpers**

OP-Besteck (Scheren, Pinzetten, Klemmen)	Fuhrmann, Much, DE
Kanülen 0,60mm x 30mm (TERUMO® NEOLUS)	Terumo, Eschborn, DE
Spritzen (1, 5, 10 und 20 ml)	Braun, Melsungen, DE
Kanülen 0,45mm x 13mm (BD Microlance™ 3)	BD Becton Dickinson, NJ, USA
Verlängerungsleitungen 30 cm (Ø 1,2 x 2,2mm)	Braun, Melsungen, DE

##### **4.1.4.2 Für die MikroCT-Untersuchung der kontrastierten Hoden**

MikroCT SkyScan_1072_80kV	SkyScan, Kontich, Belgien
---------------------------	---------------------------

**4.1.4.3 Für die Hoden-Einbettung**

Gelatinekapseln	PLANO GmbH, Wetzlar, DE
Schütteltisch Titramax 101	Heidolph, Schwabach, DE

**4.1.4.4 Für die Herstellung der Semidünnschnitte**

SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
Trimmmaschine TM 60	Leica, Wetzlar, DE
Ultramikrotom Ultracut S	Leica, Wetzlar, DE
Wärmeplatte	MEDAX, Kiel, DE

**4.1.4.5 Für die Auszählung der Kapillaren im Hoden**

Mikroskop OLYMPUS DP72 (Model BX51TF)	USA
---------------------------------------	-----

**4.1.4.6 Für die Steroidmessung**

Bruker AMX-500 500 MHz Spektrometer	Bruker Analytik, Rheinstetten, DE
DC-Platten, Kieselgel 60 F-254	Merck, Darmstadt, DE
Extrelut® NT Säule	Merck, Darmstadt, DE
Finnigan SSQ 7000 Massenspektrometer	Finnigan, Bremen, DE
GynkoteK UV Detektor	GynkoteK, Germering, DE
Hewlett Packard 5890 Series II plus GC	Agilent Technologies, Waldbronn, DE
Hewlett Packard 5972 Series Mass Selective Detektor	Agilent Technologies, Waldbronn, DE
Hewlett Packard 6890 Automatik-Sonden für Flüssigproben	Agilent Technologies, Waldbronn, DE

IR Spektrometer Modell 883	Perkin-Elmer, Raudgau-Jügesheim, DE
OV-1 fusionierte Silica-Säule	Permabond, Macherey-Nagel, Düren, DE
PLC-18-Säule	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Sephadex LH-20 Minisäule	Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
Sykam S1021 Pumpe	Sykam, Gilching, DE

#### **4.1.5 Computer-Software**

##### **4.1.5.1 Für die Auswertung der MikroCT-Aufnahmen**

ANALYZE© 9.0	Mayo Clinic, Rochester, MN, USA
CTAn	SkyScan, Kontich, Belgien

##### **4.1.5.2 Für die Auswertung der Semidünnschnitte**

newCAST, VIS (Visiopharm Integrator System)	Visiopharm, Hørsholm, Dänemark
--	--------------------------------

##### **4.1.5.3 Für die Auswertung der Wurfgrößen**

Tier.Base (Version 3.8.5, 08.10.02)	abase, P. Nielsen, Gundelfingen, DE
4D (4Dv12, Version 12.5 SAS, 1985-2012)	4D Deutschland GmbH, Eching, DE

##### **4.1.5.4 Für die statistischen Analysen**

R Version 3.0.2 (2013-09-25)  (inkl. Pakete <i>car</i> , <i>lattice</i> , <i>multcomp</i> )	R Core Team, Vienna, Österreich
---	---------------------------------

#### 4.1.6 Sonstiges

##### 4.1.6.1 Herstellung des Fixierungsgemisches mit Hepes-Puffer

*Für 1 Liter Fixierungsgemisch*

- 500 ml Hepes 0,3 molar
- 60 ml 25% Glutaraldehyd
- 60 ml 25% Paraformaldehyd
- Auf 900 ml mit Aqua dest. auffüllen
- pH 7,35 mit 1n HCL
- mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

*25%-iges Paraformaldehyd*

- 15 g Paraformaldehyd + 50 ml Aqua dest. unter Rühren auf 65°C erwärmen
- Einige Tropfen 1n NaOH dazugeben bis Lösung klar ist
- Auffüllen auf 60 ml mit Aqua dest.
- Abkühlen lassen auf Raumtemperatur

##### 4.1.6.2 Hepes-Puffer-Stammlösung

- 0,3 molar Hepespuffer
  - > 78,08 g + 800 ml Aqua dest.
  - 39,04 g + 400 ml Aqua dest.
- pH-Wert 7,35 mit 1 n HCl
- auffüllen auf 1000 ml mit Aqua dest. oder
- auffüllen auf 500 ml mit Aqua dest.
- ca. 750 mOSmol
- Gebrauchspuffer 0,15 molar

##### 4.1.6.3 Agar 100 – Ansatz (Agar 100 Resin Kit)

- Epoxy resin 48 g
- DDSA 32 g
- MNA 20 g
- Ca. 20 min mischen bei Raumtemperatur
- In Schnappdeckelgläschen zu 20 g abfüllen

(kann bei -20°C eingefroren werden)

- Vor Verarbeitung auftauen bis Raumtemperatur und je Gläschen 0,3 g BDMA (Beschleuniger) dazugeben (=1,5%)
- Ca. 20 min rühren
- (kann wieder eingefroren werden)



## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Das Tiermodell

Als Arteriosklerose-Modell wurden ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Mäuse aus der Versuchstierzucht der Experimentellen Radiologie des Fachbereichs Medizin der Universitätsklinik Gießen verwendet. Nach Erwerb dieses Stammes 2002 von Charles River, Sulzbach, DE, ist diese Linie unter Wahrung der Homozygotie in der SPF-Anlage (specific pathogen free) im Zentralen Tierlabor der Universität Gießen weitergezüchtet worden.

Zur Kontrolle dienten C57BL6/J-Mäuse, die den echten Wildtyp der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Maus darstellen. Die Tiere sind im Alter von zehn Wochen von Charles River, Sulzbach, DE erworben und bis zum gewünschten Alter in der Konventionellen Haltung des Zentralen Tierlabors der Universität Gießen gehalten worden.

In der SPF-Anlage wurde die Umgebungs- bzw. Käfigtemperatur konstant auf 22°C gehalten und es herrschten 41% Luftfeuchtigkeit. Durch Kunstlicht wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden festgelegt. Jeder Käfig wurde einzeln belüftet, um eine pathogenfreie Luftzufuhr zu gewährleisten. Die Anlage wurde nur durch ausgebildetes Fachpersonal und in Schutzkleidung betreten.

Alle Tiere sind mit Altromin Haltungsfutter in Form von Pellets gefüttert worden und haben Wasser ad libitum erhalten.

Es wurden jeweils bis zu zehn ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Mäuse und zehn C57BL6/J-Mäuse im Alter von 20, 40, 60 und 87 Wochen für den Versuch verwendet.

Bei den durchgeführten Untersuchungen handelt es sich nicht um einen Tierversuch, sondern gemäß § 4 Abs. 3 des Tierschutzgesetzes um eine Tötung von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken, die zur Organentnahme nötig war. Das Versuchsvorhaben ist unter dem Aktenzeichen GI 20/25 A 43/2011 dem Regierungspräsidium Gießen gemeldet worden.

#### 4.2.2 Präparation und Probenentnahme

Um Untersuchungen an den Maushoden durchführen zu können, musste dem Tierkörper entsprechendes Gewebe entnommen und entsprechend aufbereitet werden (Abb. 27).

Vor der Entnahme der Hoden wurde der Tierkörper über den linken Herzventrikel systemisch perfundiert (*Langheinrich et al. 2012*). Noch vor der ersten Perfusion – also direkt nach Euthanasie, wurde Blut entnommen.

*Euthanasie und Vorbereitung:* Dazu wurde die Maus tierschutzkonform mit CO<sub>2</sub> euthanasiert und anschließend gewogen. Der Tierkörper wurde in Rückenlage auf einer Unterlage platziert und an den Extremitäten fixiert. Das Bauchfell wurde befeuchtet und das Abdomen median eröffnet.

*Blutentnahme:* Die V. cava caudalis wurde durch Vorverlagern des Darmkonvolutes exploriert und mit einer dünnen Kanüle punktiert. Es wurde so viel Blut wie möglich aus der hinteren Hohlvene entnommen.

Beide Hoden wurden exploriert und vorsichtig vorgelagert, um eine bessere optische Kontrolle der späteren Perfusion zu erlangen. Der Thorax wurde median eröffnet und mit Klemmen zu beiden Seiten offengehalten. Mit einem kleinen Schnitt unter dem rechten Herzohr wurde der rechte Vorhof eröffnet, um einen venösen Abfluss zu schaffen. Der linke Herzventrikel wurde mit einer Kanüle punktiert, die mit Sekundenkleber um die Einstichstelle an der äußeren Ventrikelwand fixiert wurde.

Durch diese Kanüle wurden über eine Verlängerung die einzelnen Perfusionen mittels Spritze injiziert.

*1. Perfusion - NaCl:* Die erste Perfusion erfolgte mit ca. 10 ml heparinisierter NaCl-Lösung, bis der venöse Abfluss frei von Blut war. Diese Perfusion wurde durchgeführt, um das Kreislaufsystem blutleer zu spülen.

*2. Perfusion – Glutaraldehyd-Hepes-Fixierungsgemisch:* Als nächstes wurde über diesen Zugang die zweite Perfusion mit ca. 10 ml des zuvor hergestellten Glutaraldehyd-Hepes-Fixierungsgemisches injiziert. Das leichte postmortale Zucken einzelner Muskelgruppen oder das Aufstellen der Schwanzspitze ließ eine Sichtkontrolle einer erfolgreichen Perfusion der durchsichtigen Flüssigkeit zu.

*Erster Hoden:* Nach dieser Perfusion wurde einer der Hoden entnommen und für die Darstellung der Gefäße in der späteren histologischen Untersuchung und die Auszählung

der Kapillaren im Hoden in ein kleines Falcon-Röhrchen mit Glutaraldehyd-Hepes-Fixierungsgemisch verbracht.

3. *Perfusion – NaCl*: Es folgte eine Nachspülung des Kreislaufsystems mittels einer weiteren Perfusion mit der heparinisierten NaCl-Lösung.

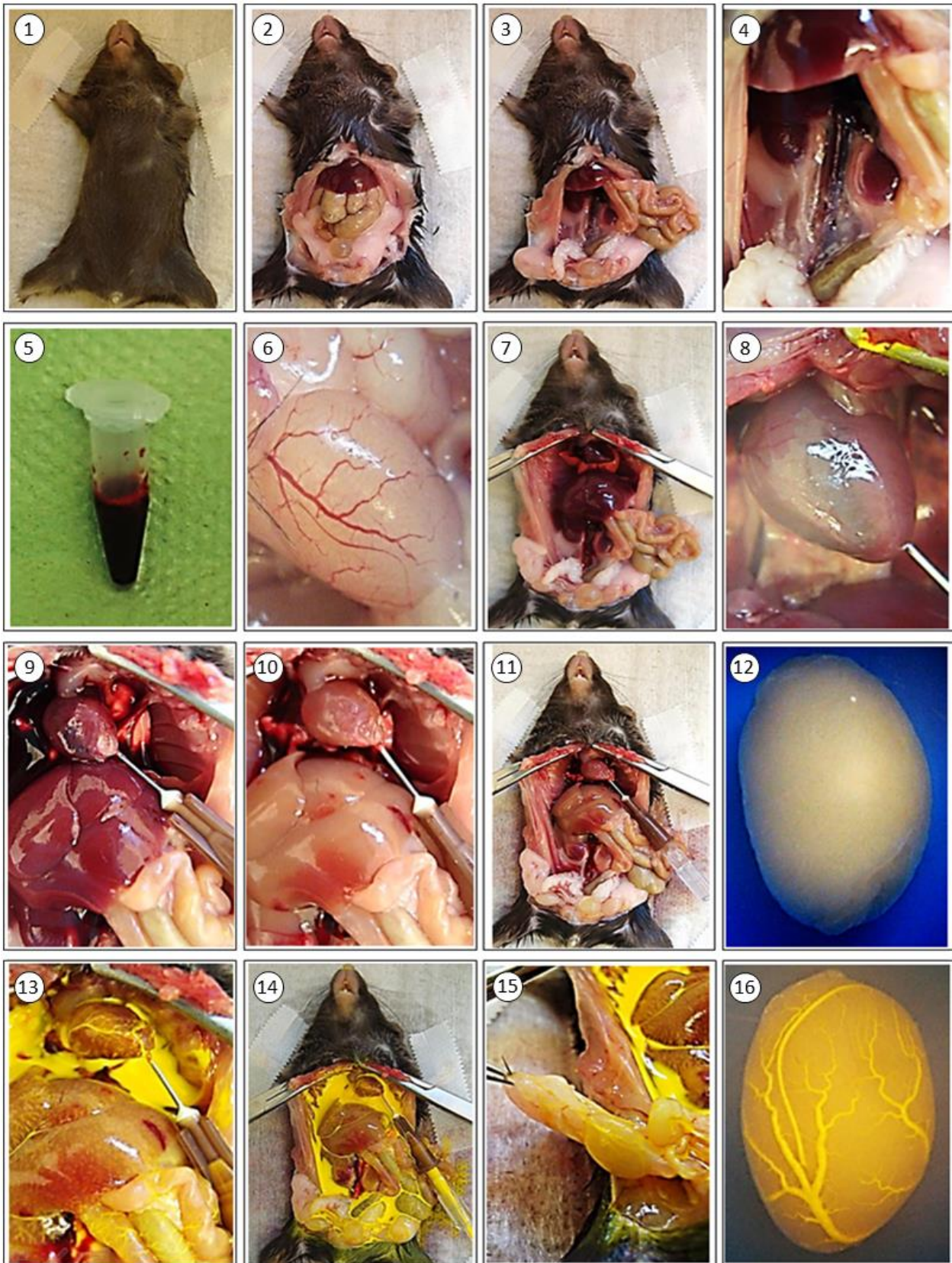
4. *Perfusion – Kontrastmittel*: Als letztes wurde das Kontrastmittel Microfil® (FLOW TECH, INC., USA) nach dem gleichen Prinzip injiziert. Die Perfusion ließ sich durch das Gelbfärben der oberflächlichen Gefäße beobachten.

*Zweiter Hoden*: Wenn der Hoden mit Kontrastmittel perfundiert war, ließ man das Kontrastmittel in den Gefäßen ca. 20 Minuten aushärten, bevor man den zweiten Hoden entnahm und ihn ebenfalls in ein kleines Falcon-Röhrchen mit Glutaraldehyd-Hepes-Fixierungsgemisch verbrachte. Der Kontrastmittelhoden wurde benötigt, um die Hodengefäße im MikroCT darstellen und untersuchen zu können (*Langheinrich et al. 2012*).

Das entnommene Blut aus der V. cava caudalis wurde für die spätere Steroidmessung in ein Eppendorfgefäß überführt und die Blutmenge notiert.

#### **4.2.2.1 Das Kontrastmittel**

Zur Kontrastierung der Gefäße für die MikroCT-Untersuchung wurde das Kontrastmittel Microfil® (FLOW TECH, INC., USA) verwendet. Hierbei handelte es sich um ein Stoffgemisch auf Kunststoffbasis, das aus drei Komponenten besteht: ein röntgendichtes gelbes Polymer, ein Diluent und ein Bindemittel. Diese drei Komponenten wurden kurz vor der Injektion im Verhältnis 1:1:0,1 zusammengemischt. Danach wurde es per Kanüle über den linken Herzventrikel in das Blutkreislaufsystems des toten Tierkörpers injiziert, bevor es etwa 20 min später zu einer gummiartigen Substanz in den Gefäßen aushärtete. Nun konnte das zu scannende Organ entnommen und für die MikroCT-Untersuchung aufbereitet werden (*Mukundan et al. 2006*).



(Abb. 27 -> Beschreibung siehe Seite 50)

**Abb. 27: Präparation und Probenentnahme: Durchführung**

- (1) *Fixierung der euthanasierten Maus in Rückenlage*
- (2) *Eröffnung des Abdomens*
- (3) *Vorverlagern des Darmkonvolutes*
- (4) *Blutentnahme aus der V. cava caudalis*
- (5) *Entnommene Blutprobe für die Steroidmessung*
- (6) *Vorverlagerung der Hoden*
- (7) *Eröffnung des Thoraxes*
- (8) *Punktierung des linken Herzventrikels mittels Kanüle nach vorheriger Eröffnung des rechten Vorhofes unter dem rechten Herzohr*
- (9) *Systemische Perfusion mit NaCl (bis Gefäßsystem blutleer ist)*
- (10) *Systemische Perfusion mit Glutaraldehyd-Hepes-Fixierungsgemisch*
- (11) *Gesamtes Gefäßsystem mit Glutaraldehyd-Hepes-Fixierungsgemisch perfundiert*
- (12) *Glutaraldehyd-Hepes-Fixierungsgemisch-perfundierter Hoden nach Entnahme*
- (13) *Systemische Perfusion mit Kontrastmittel (nach vorheriger weiterer NaCl- Perfusion)*
- (14) *Gesamtes Gefäßsystem mit Kontrastmittel perfundiert*
- (15) *Entnahme des Kontrastmittel-perfundierten Hodens*
- (16) *Kontrastmittel-perfundierter Hoden nach Entnahme*

(Abbildung siehe Seite 49)

#### 4.2.3 Mikro-Computer-Tomographie-Untersuchung des Hodens

Der mit Kontrastmittel perfundierte Hoden wurde im Mikro-Computertomographen (MikroCT\_1072\_80kV) der Firma SkyScan® (Kontich, Belgien) gescannt und es wurden dreidimensionale Bild-Datensätze erstellt, an denen das gesamte Organ und die Qualität seiner Perfusion begutachtet und später quantifiziert werden konnten (*Elliot & Dover 1982, Jorgensen et al. 1998, Wan et al. 2002, Ritman 2004, Langheinrich et al. 2012*).

Für den Scan wurde der Hoden in Parafilm®-Folie verbracht, um ein Austrocknen des Organs zu verhindern.

Der Mikro-Computertomograph (MikroCT\_1072) der Firma SkyScan® (Kontich, Belgien) besteht aus einer Mikrofokusröntgenröhre mit Kegelstrahlgeometrie, einem beweglichen Probenschlitten, einem Bilddetektor und einem Steuerungs-PC (Abb. 28).

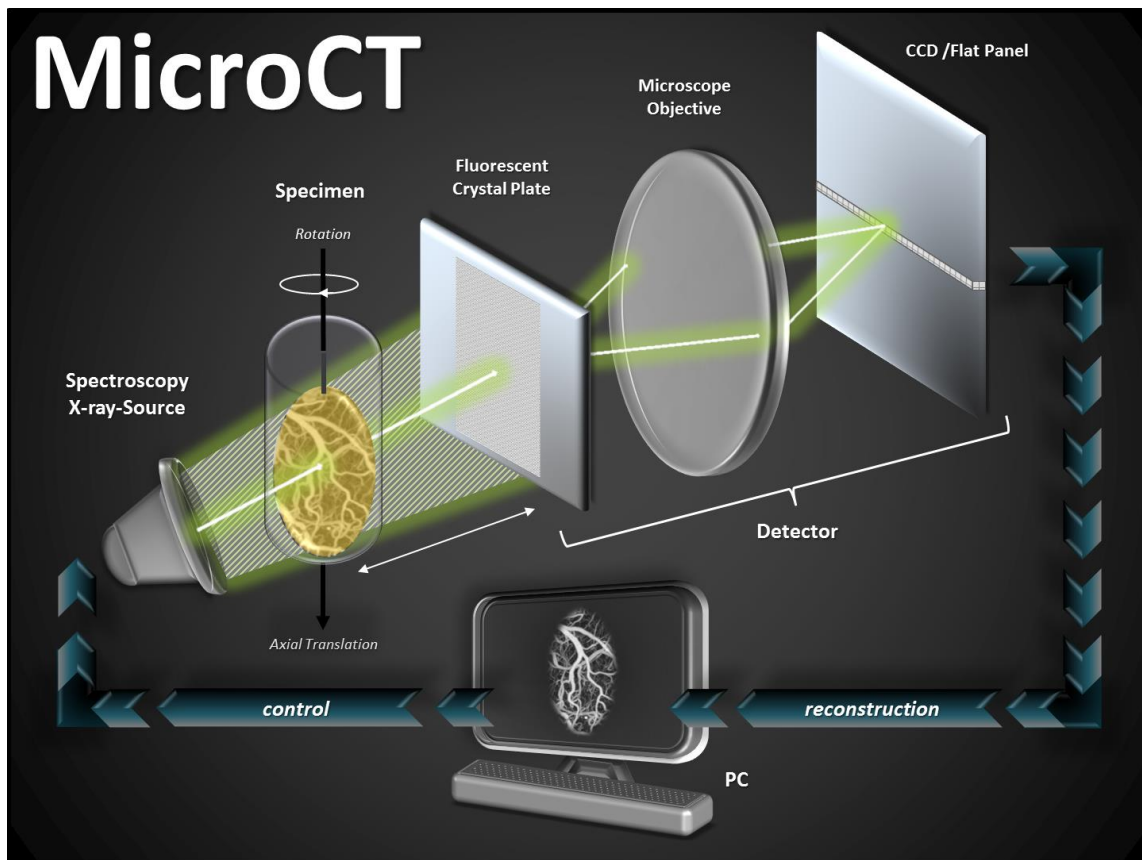
Der Einsatz der Mikrofokusröntgenröhre ist beim SkyScan 1072 80 kV innerhalb eines Spannungsbereiches von 20-80 kVp und einer Stromstärke von bis zu 100  $\mu$ A möglich, wobei die Fokusgröße des Brennflecks 8  $\mu$ m beträgt. Der Scan erfolgte bei einer Röhrenspannung von 80 kVp während der Probenträger in Winkelschritten von 0,45° um insgesamt 180° um seine vertikale Achse rotierte. Die Belichtungszeit betrug dabei 2,4 s pro Projektion. Zwecks Rauschreduktion wurde jede Position 4-fach belichtet mit anschließender Mittelung der Grauwerte.

Der Bilddetektor besteht aus einer Fluoreszenz-Kristallplatte, einer Mikroskoplinse und einer hochauflösenden 12-bit-CCD(Charge-coupled Device)-Detektorenkamera (Matrix 1024 x 1024 Pixel, Field of view 25 x 25 mm). Der an den Detektor angeschlossene Computer dient der Kontrolle des Scanvorganges und der Datenaufzeichnung.

Das zu scannende Objekt (hier Hoden) ist auf dem Probenschlitten zwischen Strahlenquelle und Detektor bewegbar. Die daraus resultierende geometrische Vergrößerung ermöglicht in Zusammenhang mit Brennfleckgröße und dem Detektor eine Auflösung von 8  $\mu$ m bei 10 % Modulations Transfer Funktion (MTF).

Die digitalen Projektionsdatensätze wurden per Computer mittels modifizierten Feldkamp-Algorithmus in Schnittbilddatensätze mit isotroper Voxelgeometrie rekonstruiert (*Elliot & Dover 1982, Jorgensen et al. 1998, Wan et al. 2002, Ritman 2004, Langheinrich et al. 2012*). Die Rekonstruktion der Datensätze erfolgte mittels eines modifizierten Feldkamp-Algorithmus, sodass zur Auswertung dreidimensionale Volumendatensätze mit einer 8-bit Grauwertverteilung bei einer isotropen Voxelgröße von 6,1  $\mu$ m Kantenlänge vorlagen.





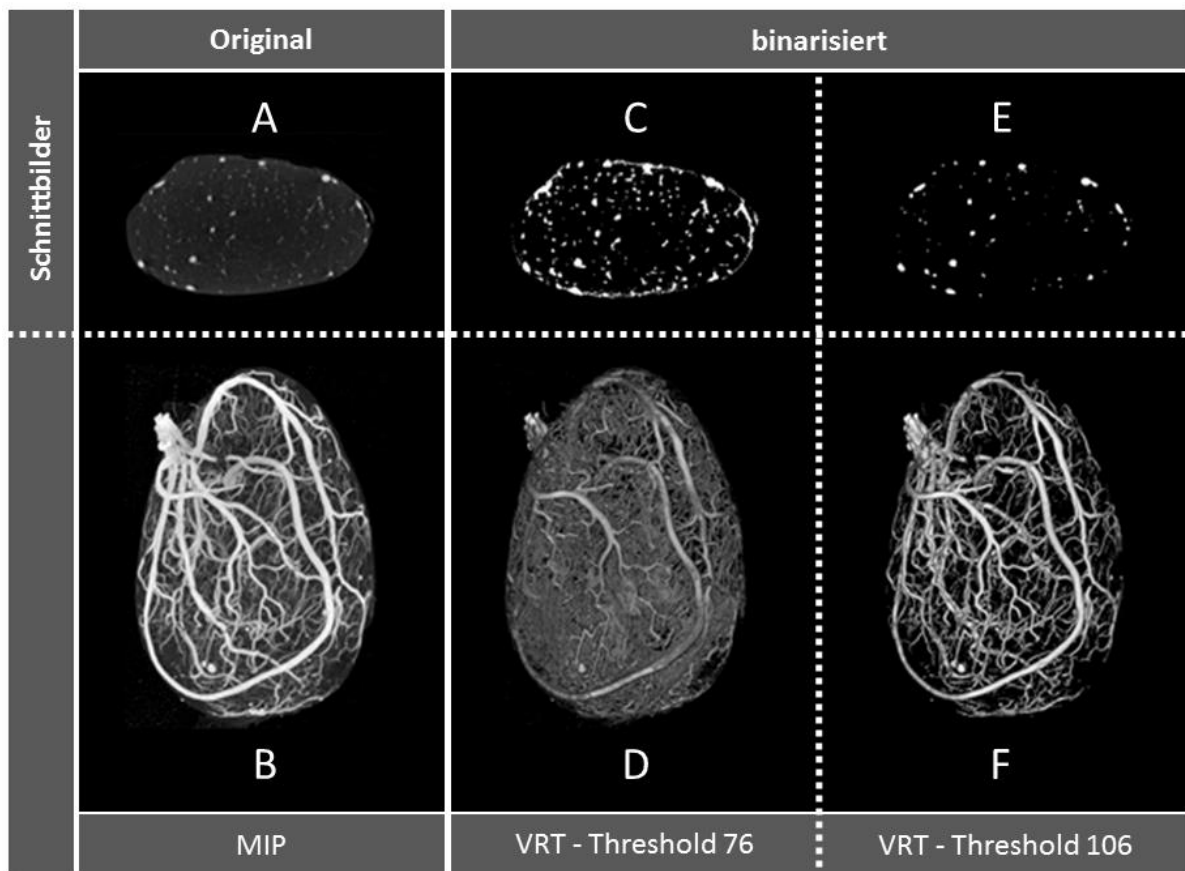
**Abb. 28: Schematische Darstellung des Strahlengangs eines Mikro-Computertomographen**

Aus der Mikrofokusröntgenröhre gelangen die Röntgenstrahlen auf die auf einem beweglichen Probenschlitten fixierte und rotierende Gewebeprobe und werden von einem Detektor aufgefangen, der wiederum aus einer Fluoreszenz-Kristallplatte, einer Mikroskoplinse und einer hochauflösenden Detektorkamera besteht. Mit dem angeschlossenen Computer werden einerseits die Projektionsdaten aufgezeichnet und andererseits der Scanvorgang kontrolliert.

(Abbildung adaptiert nach Ritman, Department of Physiology and Biomedical Engineering, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA)

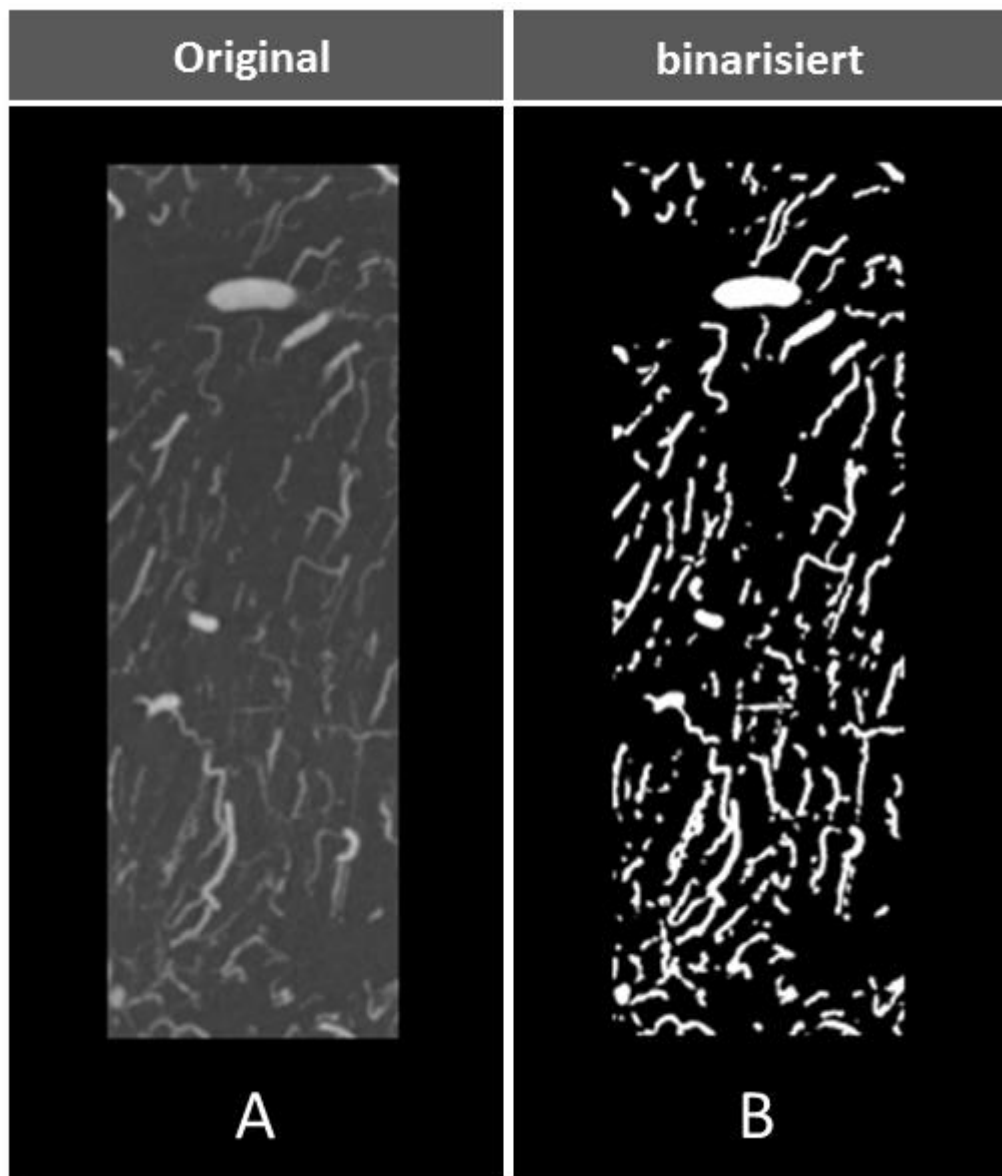
#### 4.2.3.1 Quantitative Analyse des Hodens

Mittels des Computerprogrammes ANALYZE© 9.0 (Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) wurde von jedem Hoden jeweils das testikuläre und das vaskuläre Gesamtvolumen ermittelt. Dazu wurde für die Darstellung der Hodengefäße und deren Abgrenzung vom umliegenden Gewebe für jeden Hoden ein bestimmter (adaptiver) Schwellwert (Threshold) einer Grauwert-Skala eingestellt. Durch diese Einstellung ergibt sich die Binarisierung, auf deren Grundlage das Gesamtvolumen des Hodens einerseits und das Gesamtvolumen der Gefäße andererseits ermittelt wurden (Abb. 29, 30).



**Abb. 29: 3D-Rekonstruktion eines MikroCT-Datensatzes von Schnittbildern des Hodens (Volume-Rendering-Technic = VRT).**

A: Schnittbild Grauwert; B: MIP (Maximum Intensity Projection) Grauwert; C: Schnittbild binär Threshold 76; D: VRT Threshold 76; E: Schnittbild binär Threshold 106; F: VRT Threshold 106. Durch Einstellung des Schwellwertes (Threshold) auf einen niedrigeren Wert (C) werden zentral vaskuläre gelegene Strukturen erfasst, Aufhärungsartefakte an den Rändern jedoch ebenfalls, die dann in der VRT als zu analysierende Strukturen mitberechnet werden (D). Durch Einstellung des Schwellwertes auf einen höheren Wert (E) werden Aufhärungsartefakte im Randbereich eliminiert, zentral gelegene Strukturen jedoch nicht miterfasst, die dann in der VRT fehlen und dementsprechend nicht mitberechnet werden (F).



**Abb. 30: Mikrovaskularisation und Hodenparenchym**

A: Grauwertbild (8 bit) mit intravasalem Kontrastmittel; B: nach lokal adaptierender Schwellwertermittlung (adaptive Thresholding) werden mikrovaskuläre Strukturen vollständig erfasst und können morphometrisch vollständig analysiert werden.

#### 4.2.4 Herstellung histologischer Präparate

##### 4.2.4.1 Epon-Einbettung des Hodens

Um die Kapillaren des Hodens morphologisch untersuchen zu können, wurden aus dem Hoden histologische Semidünnschnitte angefertigt. Um diese herstellen zu können, musste der Hoden stückweise in den Epoxidharz Epon eingebettet (Tab. 1) und danach am Ultramikrotom geschnitten werden. Dazu wurde das Volumen des mit Glutaraldehyd-Hepes-Fixierungsgemisch perfundierten Hoden zunächst nach dem Archimedes-Prinzip (*Scherle 1970, Noorafshan 2014*) bestimmt. Danach wurde der Hoden mit einem Skalpell in mindestens fünf Stücke zerteilt, und diese wurden in ein mit Glutaraldehyd-Hepes-Fixierungsgemisch gefülltes 2ml-Eppendorfgefäß verbracht. Danach wurden die Proben in 0,15 molarem Hepespuffer fünf mal zehn Minuten gewaschen. Es folgten zwei Stunden auf dem Schütteltisch (Titramax 101, Heidolph, Schwabach, DE) in H<sub>2</sub>O mit 1%iger Osmiumsäure. Danach wurde die Probe wieder drei mal zehn Minuten in H<sub>2</sub>O gewaschen. Durch halb gesättigte Uranylacetatlösung, die vorher mit einem 200 nm-Filter filtriert wurde, wurde die Probe lichtgeschützt über Nacht kontrastiert. Es folgten zwei 15minütige Waschschrte mit H<sub>2</sub>O, vor der Entwässerung mit der aufsteigenden Ethanol-Reihe (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) von jeweils zehn Minuten. Danach wurde die Probe nochmals zehn Minuten mit 100%igem Ethanol, dann 15 Minuten mit 100%igem Ethanol und Propylenoxid im Verhältnis 1:1 behandelt. Es folgten 60 Minuten in Propylenoxid mit Epon (und Beschleuniger) im Verhältnis 1:1, bevor reines Epon auf die Probe gebracht und diese über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt wurde. Nach mindestens 12 Stunden wurden die Proben für zwei bis drei Stunden im Exsikkator entgast und danach die einzelnen Hodenstücke in beschriftete Gelatinekapseln mit Epon eingebettet. Dabei war es wichtig, dass jedes Gewebestück in die Kapsel „fallengelassen“ und exakt in dieser Position eingebettet wurde, in der es sich nach dem Fall zufällig in der Kapsel befand (*Stringer et al. 1982*). Die mit Epon gefüllten Gelatinekapseln mussten mindestens(!) 48 Stunden im Trockenschrank bei 60°C aushärten. Erst danach erhielt man Eponblöckchen (Abb. 31), die hart genug waren, um daraus Semidünnschnitte anfertigen zu können. Da der Hoden kein homogenes Gewebe ist, sondern aus Kanälchen und dazwischenliegendem Bindegewebe besteht, ist bei der Einbettung besondere Vorsicht geboten, damit das Gewebe nicht auseinanderdriftet und die entstehenden Schnitte für die Untersuchungen unbrauchbar werden, so dass sie von der Auswertung der Stereologie ausgeschlossen werden müssen.

Nachträglich zeigte sich, dass bei der Einbettung der Hoden der 20 Wochen alten Mäuse Einbettungsartefakte vorhanden waren.

## Übersicht Hoden – Einbettung

Waschen in 0,15 m Hepespuffer	5 x 10 min	auf dem Schütteltisch
1%ige Osmiumsäure in H <sub>2</sub> O	2 h	auf dem Schütteltisch
Waschen in H <sub>2</sub> O	3 x 10 min	auf dem Schütteltisch
Kontrastieren in halb gesättigter Uranylacetatslösung (vorher durch 200 nm Filter drücken)	über Nacht	Lichtgeschützt!
Waschen in H <sub>2</sub> O	2 x 15 min	auf dem Schütteltisch
Entwässerung (mit aufsteigender Ethanol-Reihe):		auf dem Schütteltisch
30% Ethanol	10 min	
50% Ethanol	10 min	
70% Ethanol	10 min	
90% Ethanol	10 min	
100% Ethanol	2 x 10 min	
100%ges Ethanol + Propylenoxid	15 min	im Verhältnis 1:1
Propylenoxid + Epon (mit Beschleuniger)	60 min	im Verhältnis 1:1
Epon (mit Beschleuniger)	über Nacht	im Kühlschrank!
Entgasen im Exsikkator	2-3 h	
Einzelne Hodenstücke in Gelatinekapseln	1 Stück pro Kapsel	in der Position, in die Hodenstück zufällig „hineinplumpst“
Frisches Epon	48 h (mindestens!)	im Trockenschrank (60°C)

**Tab. 1: Übersicht Hoden-Einbettung**

#### 4.2.4.2 Herstellung der Gewebe-Semidünnschnitte

Nach der Epon-Einbettung wurden die Eponblöckchen (Abb. 31) in eine Trimmmaschine (TM 60, Leica, Wetzlar, DE) eingespannt und getrimmt, sodass der Epon um das Gewebe herum entfernt wurde und die Proben geschnitten werden konnten.



**Abb. 31: Eponblöckchen aus Gelatinekapseln**

*Links: ungetrimmt – das Gewebestück (dunkel) ist noch von Epon und der Kapselhülle umhüllt.*

*Rechts: getrimmt – die Kapselhülle und der Epon um das Gewebestück (dunkel) herum ist abgefräst, der pyramidenförmig freiliegende Teil der Probe kann nun geschnitten werden.*

Dazu wurden die getrimmten Blöckchen in das Ultramikrotom (Ultracut S, Leica, Wetzlar, DE) eingespannt und Gewebescheiben von 0,75 µm Dicke von dem Gewebelöckchen abgetrennt. Sicherheitshalber wurden pro Block drei Semidünnschnitte auf den Objektträger verbracht.

Danach wurde der Objektträger zum Trocknen auf die Wärmeplatte (Medax, Kiel, DE) gelegt. Nachdem dieser getrocknet war, wurden ein Tropfen Methylenblau und ein Tropfen Tri-Kalium-Phosphat auf die Probe gebracht und der Objektträger nochmals zum Färben 1 min auf die Wärmeplatte gelegt. Nachdem der Objektträger abgekühlt war, wurde dieser unter fließendem Wasser abgespült und trocken gelassen.

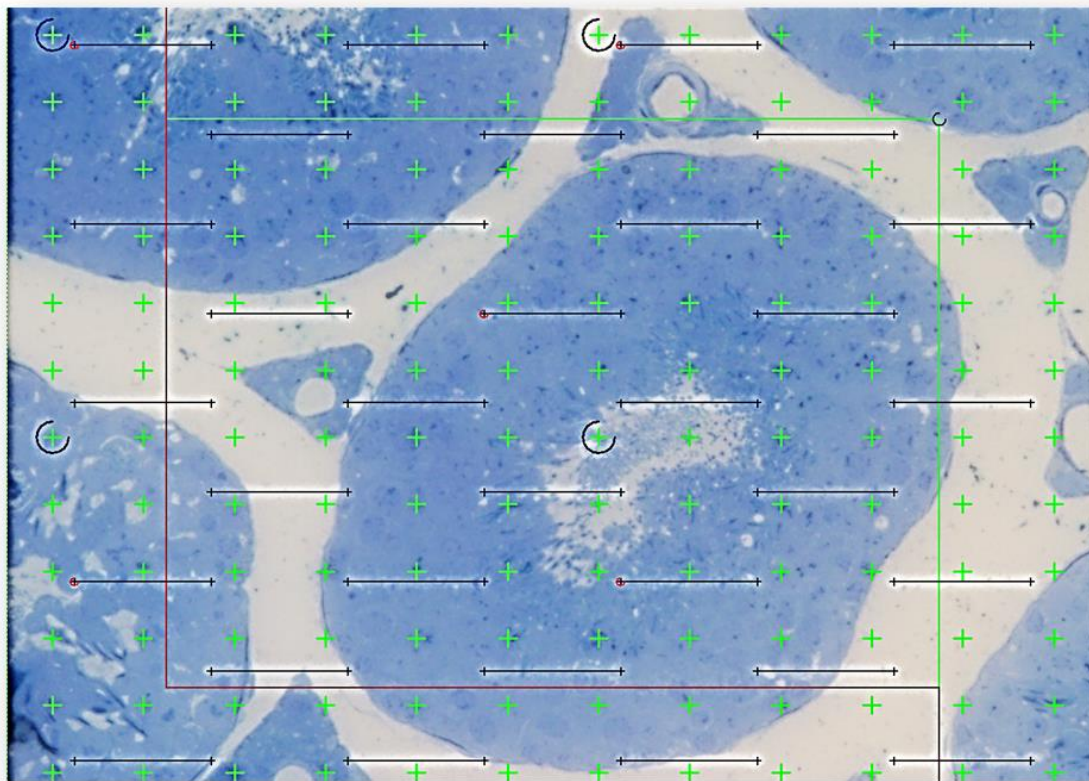
Pro Maus wurden somit aus bis zu fünf Eponblöckchen Semidünnschnitte hergestellt und mikroskopisch untersucht.



#### 4.2.5 Bestimmung der Kapillarparameter

Um die Länge, das Volumen und die luminale Oberfläche der Hodenkapillaren bestimmen zu können, wurden diese zunächst an den histologischen Semidünnschnitten ausgezählt.

Dazu wurde jeder Objektträger in das mit einer Digitalkamera ausgestattete Mikroskop (Olympus DP72, BX51TF, USA) eingespannt und in der Stereologie-Software newCAST bearbeitet, die auf dem Visiopharm Integrator System (VIS) Programm (Visiopharm, Hørsholm, Dänemark) basiert und es ermöglicht, durch Einstellen bestimmter Zählgitter (Abb. 32), spezielle Punkte einer Struktur zu zählen. Dazu wurde jeder Schnitt bei 1,25-facher Vergrößerung des Objektives virtuell mit einer Maske umrandet und bei 40-facher Vergrößerung des Objektives die jeweiligen Zählgitter eingestellt.

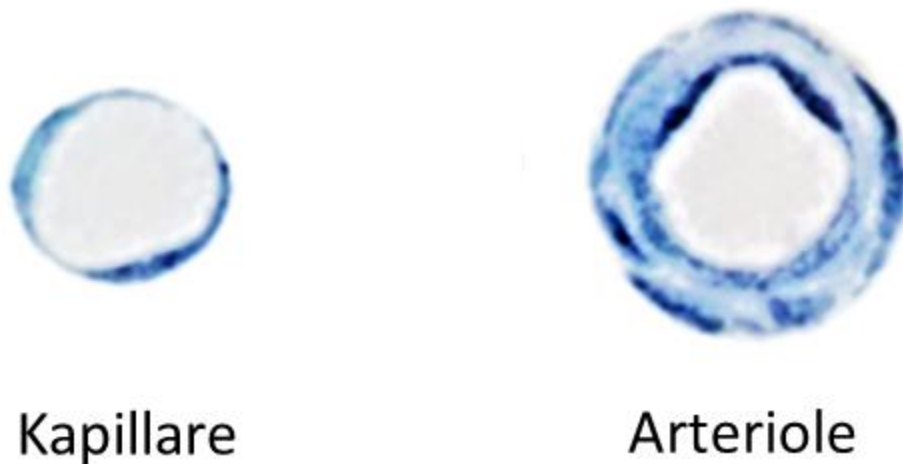


**Abb. 32: Zählgitter**

*Mikroskopische Aufnahme eines Bildausschnittes eines histologischen Semidünnschnittes (Methylenblaufärbung) eines Maushodens mit allen drei Zählgittern (Vergrößerung: Ok.10, Obj.40).*

Für die Auszählung der Kapillaren für die spätere Bestimmung von Länge, Volumen und Oberfläche, wurde jeder Bildausschnitt jeweils mit einem Zählramen (Counting Frame => Länge) (Abb. 35, 36), einem Punktgitter (Point Grid => Volumen) (Abb. 37, 38) und einem Liniengitter (Line Grid => Oberfläche) (Abb. 39, 40) belegt.

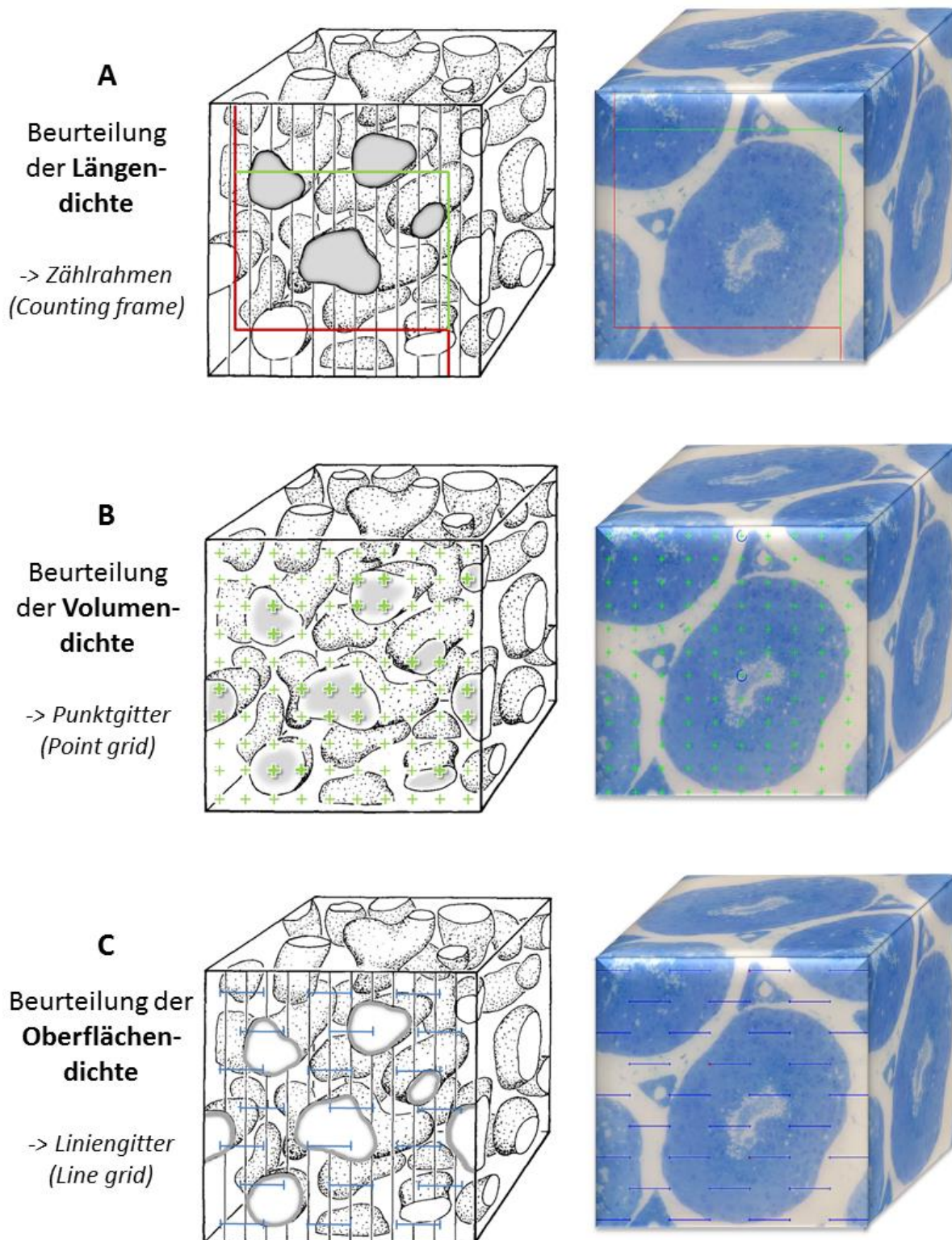
Wichtig für die Auszählung der Kapillaren ist die Differenzierung dieser von anderen Gefäßen (Arterien, Venolen, Arteriolen etc.) (Abb. 33).



**Abb. 33: Unterschied einer Kapillare zu einer Arteriole**

*Kapillaren unterscheiden sich morphologisch zu den Arteriolen u.a. in ihrem Wandaufbau.*

Das Prinzip dieser Methode ist, durch ein Testsystem – je nach gesuchter Information bestehend aus einer bestimmten Fläche, Punkten oder Linien – von einem zweidimensionalen zufälligen Schnitt eines Probenmaterials seine dreidimensionale Struktur bestimmen zu können (Abb. 34) (Mattfeldt et al. 1990, Nyengaard & Gundersen 1992, Mayhew 2008). Durch das Auszählen der positiven Ereignisse durch das Testsystem mit der Struktur des zweidimensionalen Gewebeschnittes, erhält man die jeweilige Dichte (Längendichte, Volumendichte, Oberflächendichte), die später durch die jeweilige Formel mit dem Gesamtvolumen verrechnet wird und dadurch die absoluten Messwerte (Länge, Volumen, Oberfläche) der jeweiligen Struktur bestimmten lassen (Weibel et al. 1966).



**Abb. 34: Prinzip des Testsystems**

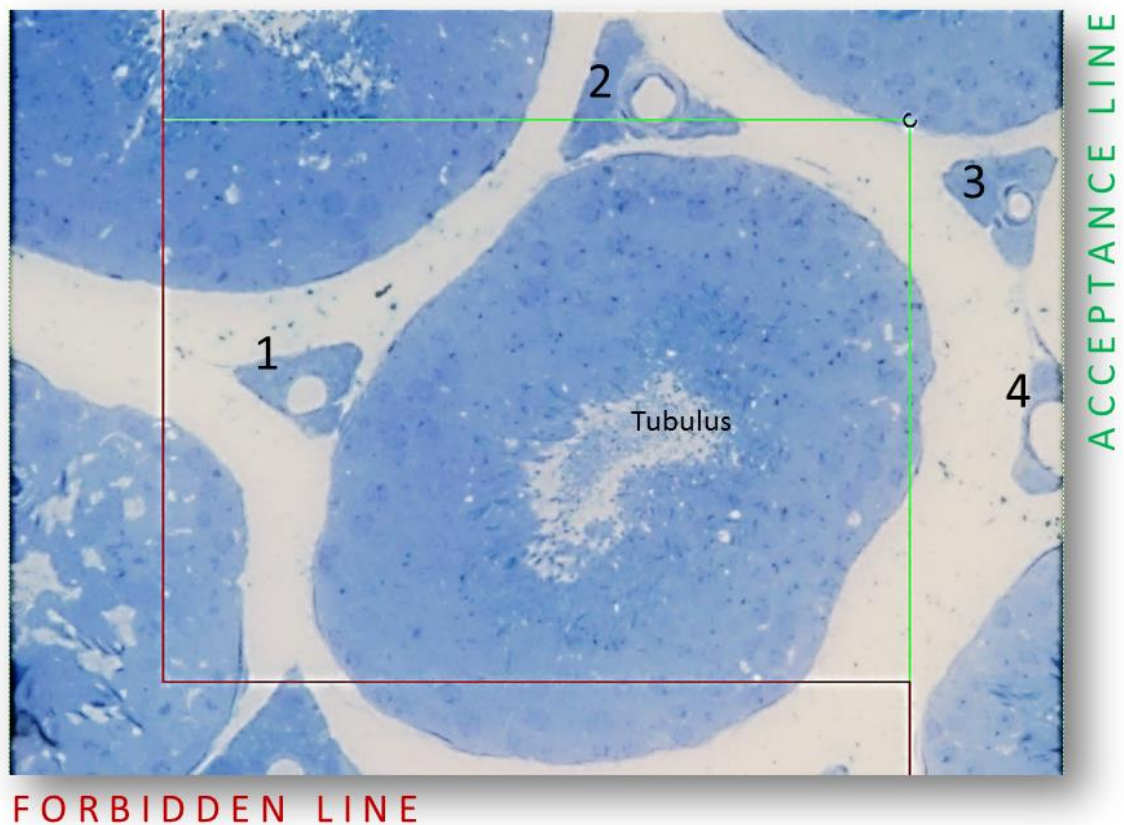
Beurteilung der Längen-(A), Volumen-(B) und Oberflächendichte(C) durch Fläche(A), Punkte(B) und Linien(C) am zweidimensionalen Schnitt eines dreidimensionalen „Zufallsgewebeblock“.

(Abbildung modifiziert nach Weibel et al. 1966)



#### 4.2.5.1 Bestimmung der kapillaren Längendichte

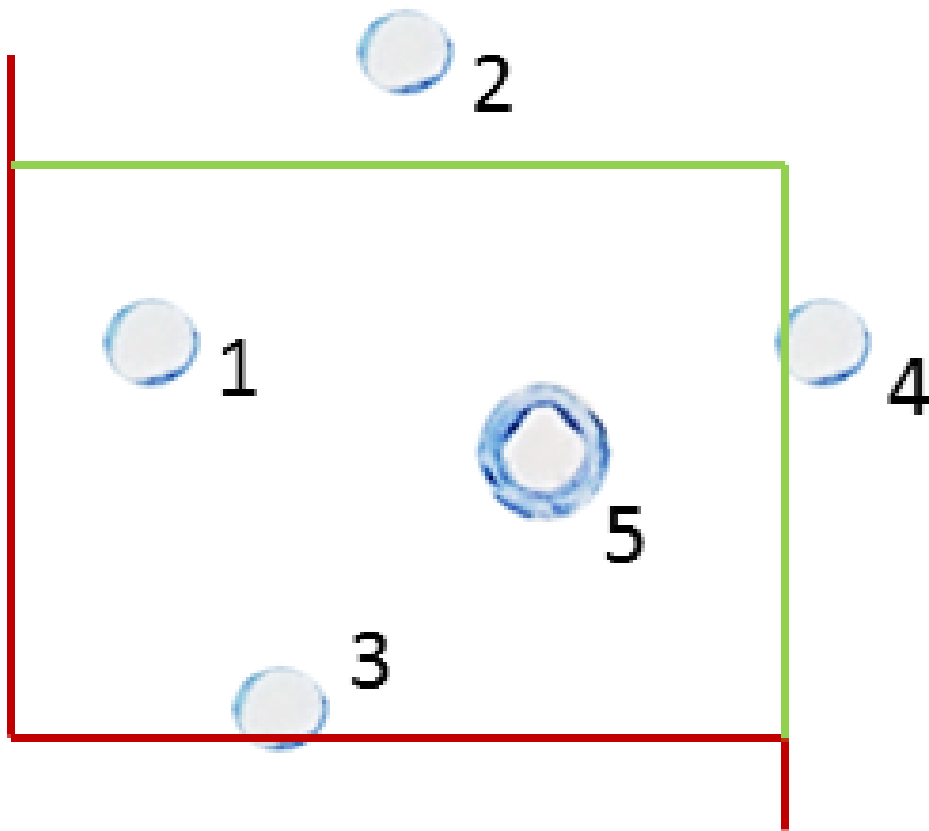
Um mittels Formel die Gesamtlänge der Kapillaren ermitteln zu können, wurden die Anzahl der Kapillaranschnitte in einem Zählrahmen (*Counting Frame*) (Abb. 35, 36) bestimmter Größe ( $47.407,22 \mu\text{m}^2$ ) gezählt, ebenso die Anzahl der Ecken des Counting Frames, die sich innerhalb des Referenzbereiches – also innerhalb der zuvor erstellten Maske befinden. Berührt eine Kapillare die rote *Forbidden Line*, so wird diese Kapillare nicht mitgezählt, auch wenn sie sich innerhalb des Zählrahmens befindet. Berührt eine Kapillare die grüne *Acceptance Line*, so wird diese Kapillare mitgezählt, auch wenn sie sich nicht komplett innerhalb des Zählrahmens befindet (*Mattfeldt & Mall 1987, Mattfeldt et al. 1990, Wiest et al. 1992, Villar & Mandarim-de-Lacerda 1995*).



**Abb. 35: Beispiel für die Auszählung der kapillaren Längendichte mittels Zählrahmen (Counting Frame)**

- (1) Kapillare, die sich innerhalb des Zählrahmens befindet (-> wird mitgezählt)
- (2) Arteriole (-> wird NICHT mitgezählt)
- (3) Arteriole und außerhalb des Zählrahmens (-> wird NICHT mitgezählt)
- (4) Kapillare, die sich außerhalb des Zählrahmens befindet (-> wird NICHT mitgezählt)

(Vergrößerung: Ok.10, Obj.40)

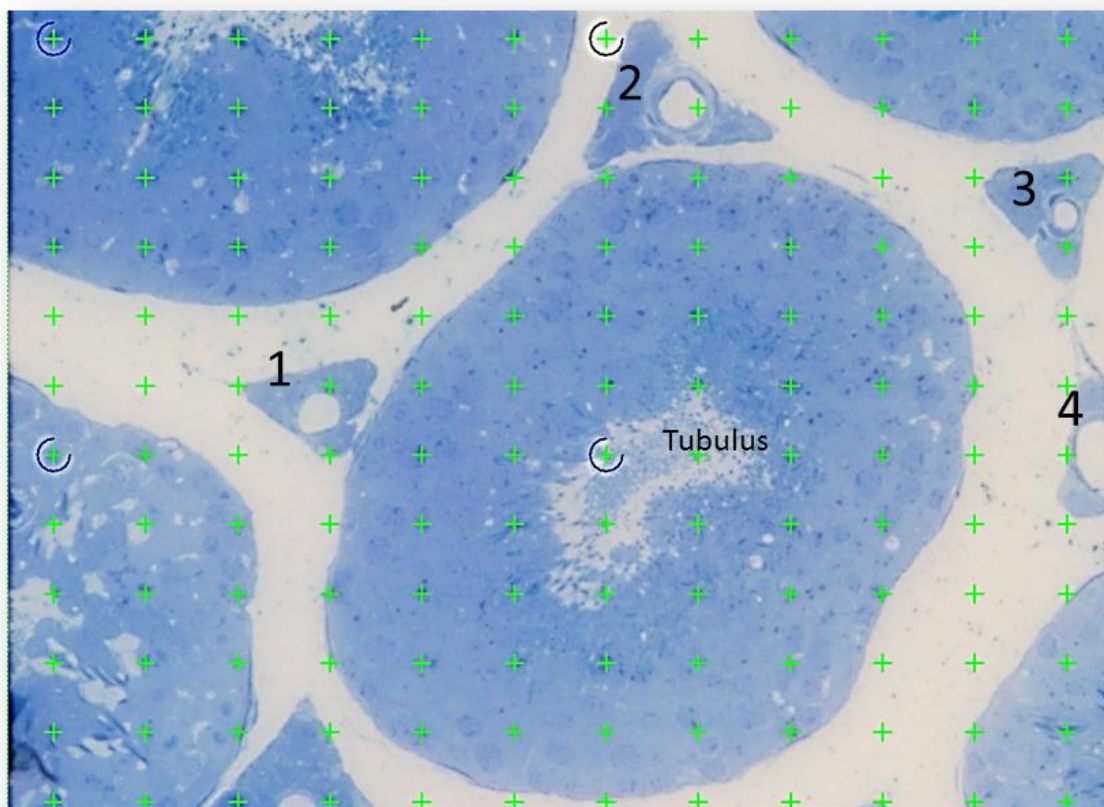


**Abb. 36: Zählereignisse im Counting Frame**

- (1) Kapillare innerhalb des Counting Frames (-> wird gezählt)
- (2) Kapillare außerhalb des Counting Frames (-> wird NICHT gezählt)
- (3) Kapillare, die die **Forbidden Line** berührt (-> wird NICHT gezählt)
- (4) Kapillare, die die **Acceptance Line** berührt (-> wird gezählt)
- (5) Arteriole innerhalb des Counting Frames (-> wird NICHT gezählt)

#### 4.2.5.2 Bestimmung der kapillaren Volumendichte

Um ebenfalls mittels einer bestimmten Formel das Gesamtvolumen der Kapillaren bestimmen zu können, wurde ein Punktgitter (*Point Grid*) (Abb. 37, 38) virtuell auf jeden Ausschnitt des jeweiligen Schnittes gelegt und die Anzahl der Punkte gezählt, die das Lumen einer Kapillare treffen, im Verhältnis zur Anzahl der Gesamtanzahl aller Punkte innerhalb des Referenzbereiches (Villar & Mandarim-de-Lacerda 1995, Van Vré et al. 2007).



**Abb. 37: Beispiel für die Auszählung der kapillaren Volumendichte mittels Punktgitter (Point Grid)**

- (1) Punkt befindet sich NICHT im Lumen der Kapillare (-> wird gezählt als im Referenzbereich befindlicher Punkt)
- (2) Arteriole (-> wird gezählt als im Referenzbereich befindlicher Punkt)
- (3) Arteriole, außerdem befindet sich Punkt nicht im Lumen (-> wird gezählt als im Referenzbereich befindlicher Punkt)
- (4) Punkt befindet sich NICHT im Lumen der Kapillare (-> wird gezählt als im Referenzbereich befindlicher Punkt)

(Vergrößerung: Ok.10, Obj.40)



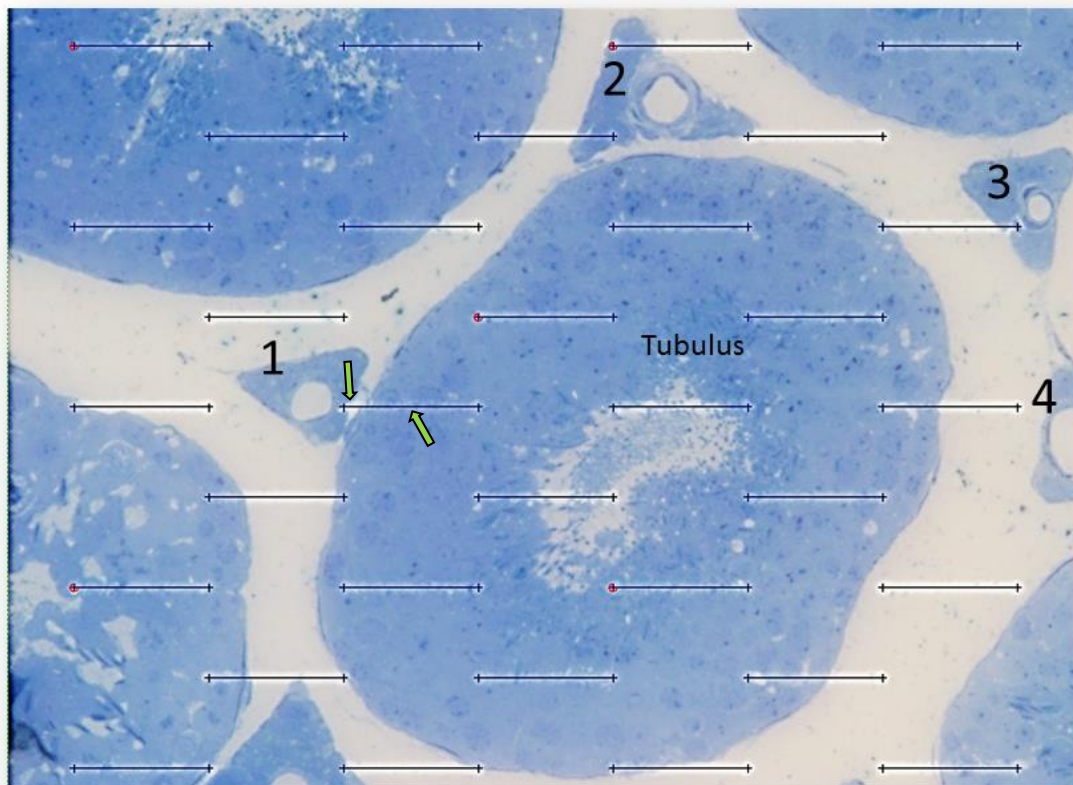


**Abb. 38: Zählereignisse im Point Grid**

- (1) Punkt befindet sich außerhalb des Kapillarlumens (-> wird gezählt als im Referenzbereich befindlicher Punkt)
- (2) Punkt befindet sich innerhalb des Kapillarlumens (-> wird gezählt)
- (3) Punkt befindet sich auf der Kapillarwand. Kapillare befindet sich im oberen rechten Viertel des Punktkreuzes (-> wird gezählt)
- (4) Punkt befindet sich auf der Kapillarwand. Kapillare befindet sich jedoch NICHT im oberen rechten Viertel (Pfeil) des Punktkreuzes (-> wird gezählt als im Referenzbereich befindlicher Punkt)
- (5) Punkt befindet sich im Lumen einer Arteriole (-> wird gezählt als im Referenzbereich befindlicher Punkt)

#### 4.2.5.3 Bestimmung der kapillaren Oberflächendichte

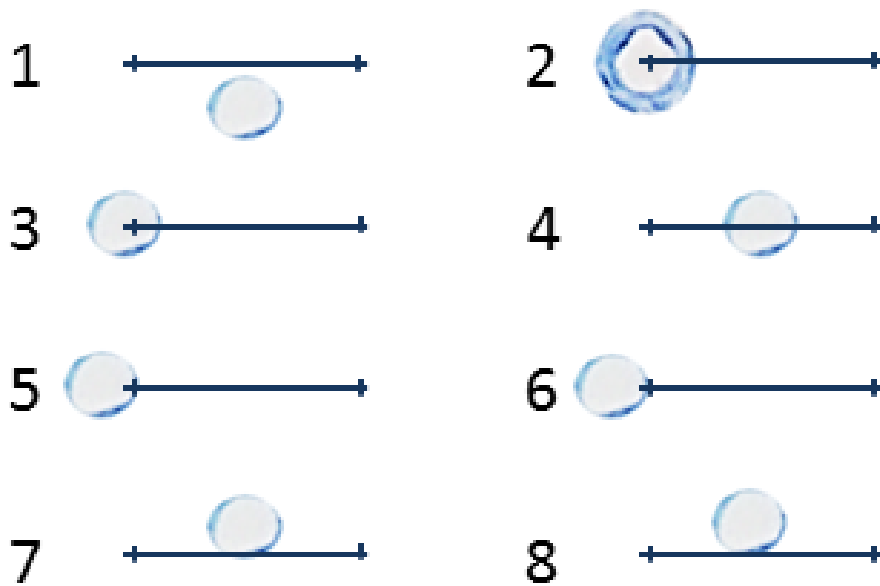
Für die spätere Bestimmung der luminalen Kapillaroberfläche wurde ein Liniengitter (*Line Grid*) (Abb. 39, 40) mit Linien einer bestimmten Länge ( $44,36 \mu\text{m}$ ) verwendet und die Anzahl der Schnittpunkte einer Linie mit dem luminalen Kapillarendothel gezählt im Verhältnis zur Gesamtlänge der Linie im Referenzbereich (Mattfeldt & Mall 1987, Mattfeldt et al. 1990).



**Abb. 39: Beispiel für die Auszählung der kapillaren Oberflächendichte mittels Liniengitter (Line Grid)**

- (1) Grüne Pfeile: Testinie schneidet das Endothel dieser Kapillare nicht (-> wird also zum Referenzbereich gezählt)
- (2) Arteriole
- (3) Arteriole
- (4) Kapillare

(Vergrößerung: Ok.10, Obj.40)



**Abb. 40: Zählereignisse im Line Grid**

- (1) Linie schneidet das Kapillarendothel nicht (-> wird zum Referenzbereich gezählt)
- (2) Linie schneidet das Endothel einer Arteriole (-> wird zum Referenzbereich gezählt)
- (3) Linie schneidet das Endothel einer Kapillare (-> wird gezählt)
- (4) Linie schneidet das Endothel einer Kapillare 2 x (-> also zwei Schnittpunkte mit dem Kapillarendothel -> wird 2 x gezählt)
- (5) Linie liegt auf dem luminalen Endothel der Kapillare (-> wird gezählt)
- (6) Linie liegt auf der Kapillarwand, schneidet das luminale Endothel aber nicht (-> wird zum Referenzbereich gezählt)
- (7) Linie liegt auf dem luminalen Endothel der Kapillare (-> wird gezählt)
- (8) Linie liegt auf der Kapillarwand, schneidet das luminale Endothel aber nicht (-> wird zum Referenzbereich gezählt)

Von jeder Maus wurden Bildausschnitte von bis zu fünf Semidünnschnitten ausgewertet und am Ende alle Werte des jeweiligen Parameters summiert.

Um aus den Summen der jeweiligen Parameter die Länge, das Volumen und die Oberfläche der Kapillaren zu bestimmen, wurden diese in die folgenden Formeln eingesetzt.

#### 4.2.6 Berechnung von Kapillarlänge, -volumen und -oberfläche

Um die Parameter Länge, Volumen und Oberfläche der Hodenkapillaren zu bestimmen, wurden die jeweiligen Summen der bereits ausgezählten Punkte aus dem newCAST (Visiopharm Integrator System (VIS), Visiopharm, Hørsholm, Dänemark) verwendet. Diese wurden zur Berechnung der Längendichte, der Volumendichte bzw. der Oberflächendichte zueinander ins Verhältnis gesetzt und das jeweilige Ergebnis mit dem zuvor bestimmten Hodengesamtvolumen verrechnet (*Weibel et al. 1966, Stringer et al. 1982, Mühlfeld et al. 2010, Mühlfeld 2014, Noorafshan 2014*).

##### 4.2.6.1 Berechnung der Kapillarlänge

$$L_V = \frac{2 * Q}{A} = \frac{2 * Q}{a(p) * P}$$

$$L = L_V * V_{(Hoden)}$$

(*Q=Anzahl der Kapillaren; A=Fläche des Zählrahmens; a(p)=Fläche pro Punkt*)

##### 4.2.6.2 Berechnung des Kapillarvolumens

$$V_V = \frac{\sum \text{von } P(\text{Cap})}{\sum \text{von } P(\text{total})}$$

$$V = V_V * V_{(Hoden)}$$

(*P(Cap)=Punkte auf den Kapillaren; P(total)=Punkte insgesamt*)

##### 4.2.6.3 Berechnung der Kapillaroberfläche

$$S_V = \frac{2 * \sum l}{\sum P * l / P}$$

$$S = S_V * V_{(Hoden)}$$

(*l=Anzahl der Schnittpunkte auf den Kapillaren; l=Länge der Testlinie; P=Anzahl aller Punkte im Referenzraum; l/P=Länge der Testlinie pro Punkt*)

#### 4.2.7 Hormonmessung / Steroidbestimmung

Um Testosteron und weitere Steroide zu bestimmen, wurden die Blutproben zentrifugiert und das abgetrennte Serum mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) untersucht.

Diese aufwendige Methode besteht aus mehreren Teilschritten: Inkubation der Proben über Nacht, Extraktion der Steroide mittels Extrelut® Säulen (Merck, Darmstadt, Deutschland), Aufreinigung über Sephadex LH-20 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) und anschließende Derivatisierung mit HFBA (Heptafluorobutyric Anhydrid, Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) (*VandenHeuvel & Horning 1960, Wudy et al. 2002; Sánchez-Guijo et al. in Wheeler 2013*).

Die Steroidbestimmung mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie wurde von und in enger Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Stefan A. Wudy und Frau Dr. Michaela F. Hartmann vom Steroid- und Peptidhormonlabor des Uniklinikums Gießen-Marburg in Gießen durchgeführt.

#### 4.2.8 Auswertung der Wurfgrößen

Um die Untersuchungen zu komplementieren wurden die Wurfgrößen und die Häufigkeitsverteilung der Wurfgrößen ausgewertet, wobei die Wurfgröße die Anzahl geborener Jungtiere pro Wurf darstellt und die Häufigkeitsverteilung der Wurfgrößen die prozentuale Verteilung sämtlicher Wurfgrößen auf die Gesamtzahl der Würfe pro Mauslinie repräsentiert.

Dazu wurden die Daten aus unserer Zuchtdatenbank TierBase ausgewertet, wobei nur die Anzahlen der geborenen Jungtiere pro Wurf erörtert und andere Faktoren (z.B. Jungtiersterblichkeit) nicht berücksichtigt wurden. Bei den ausgewerteten Würfen handelte es sich um 109 Würfe von ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Mäusen und 43 Würfe von C57BL6/J-Mäusen, die allesamt aus 1:1-Verpaarungen hervorgegangen sind.

Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass es sich hierbei nicht um eine prospektive Verpaarungsstudie handelte, sondern dass retrospektiv die Auswertung bereits vorliegender Daten aus der Zuchtdatenbank separat für C57BL6/J-Mäuse und ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Mäuse erfolgte. Aus diesem Grunde wurden hier männliche ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Mäuse ausschließlich mit weiblichen ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Mäusen verpaart und nicht zusätzlich mit weiblichen C57BL6/J-Mäusen und umgekehrt.

#### 4.2.9 Statistische Analyse

Die zuvor in Excel-Dateien gespeicherten Rohdaten wurden in R Version 3.0.2 (*R Development Core Team 2013*) importiert und ausgewertet.

Um einen potentiellen Einfluss des Alters (in Altersgruppen; 20, 40, 60 und 87 Wochen) und der Stammeszugehörigkeit (WT, KO) (inkl. eventueller Wechselwirkungen) auf die einzelnen Parameter (Testosteron, AD, Corticosteron [20, 40, 60, 87]; Hodenvolumen, Gefäßvolumen [20, 40, 60]; absolute Kapillarlänge, -volumen, -oberfläche [40, 60, 87] und relative Kapillarlänge, -volumen, -oberfläche [40, 60, 87]) zu ergründen, wurde für jeden der Parameter eine (univariate) zweifaktorielle ANOVA (Varianzanalyse) durchgeführt, mit der die Haupteffekte von Altersgruppen und Stammeszugehörigkeit sowie der Interaktionseffekt zwischen den beiden analysiert werden. Ob die ANOVA jeweils zulässig war, wurde mit modelldiagnostischen Graphiken (Residualplots und Quantil-Quantil-Plots) qualitativ überprüft (*Fox & Weisberg 2011*). Es wurden jeweils keine markanten Indizien gegen die Zulässigkeit der Annahmen gefunden.

Im Anschluss an eine jede zweifaktorielle ANOVA wurde mit Hilfe von multiplen Mittelwertsvergleichen für jede Altersgruppe ein Vergleich der beiden Stämme (WT, KO) vorgenommen. Für die Mittelwertsdifferenzen zwischen den beiden Stämmen wurden simultane Konfidenzintervalle berechnet (*Hothorn et al. 2008, Bretz et al. 2010*).

Für die univariate explorative Datenanalyse wurden Boxplots mit überlagerten Rohdaten und für die multivariate explorative Datenanalyse Parallelplots angefertigt (*Sarkar 2008*).

Für die Analyse der gemeinsamen Verteilung kapillarer Parameter (absolute Kapillarlänge, -volumen und -oberfläche sowie relative Kapillarlänge, -volumen und -oberfläche) wurde eine multivariate inferenzstatistische Analyse mit Hilfe einer MANOVA (multivariate Varianzanalyse) durchgeführt.

Die Verteilungen der Wurfgrößen der beiden Stammesgruppen (WT, KO) wurden mittels Fishers exaktem Test und zusätzlich ihre arithmetischen Mittelwerte mit Welchs Zwei-Stichproben-t-Test verglichen. (Aufgrund der großen Fallzahl von 152 insgesamt wurde der t-Test als zulässig erachtet.)

Bei allen Auswertungen wurde ein Wert von  $p < 0,05$  als signifikant angesehen.

Die statistischen Analysen wurden von und in enger Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Gerrit Eichner vom Mathematischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.



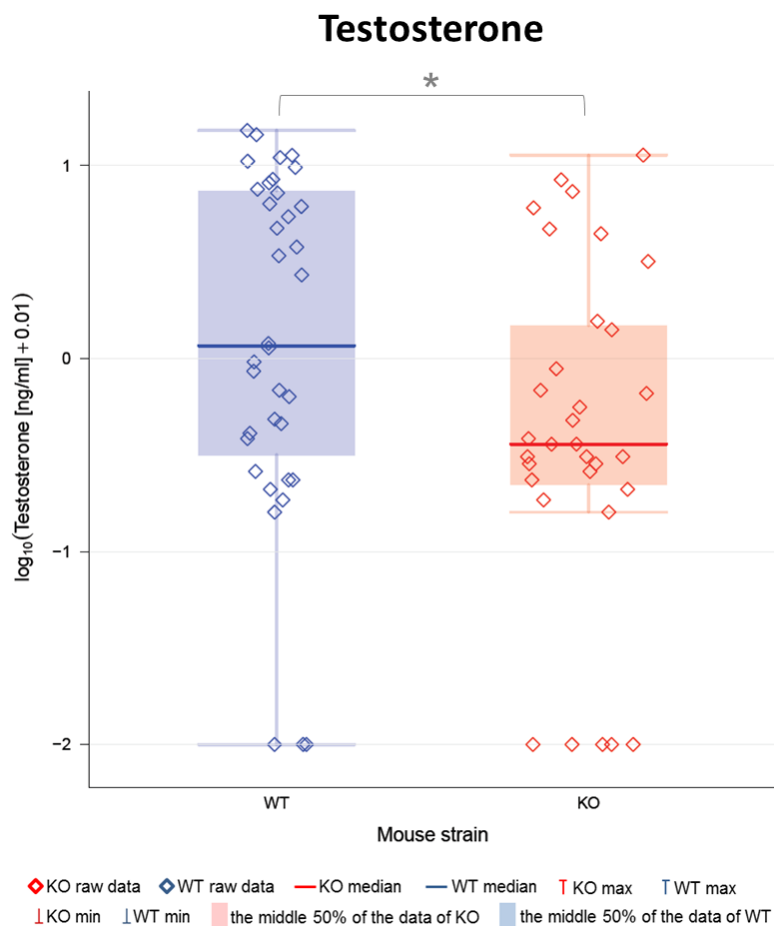
## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Ergebnisse der Steroidmessung

Von allen Mäusen wurden Serumproben mittels Gaschromatograph-Massenspektrometrie (GC-MS) untersucht und jeweils die Steroidhormone Testosteron, AD (5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol) und Corticosteron bestimmt.

#### 5.1.1 Testosteron, AD und Corticosteron – alle Altersgruppen zusammen

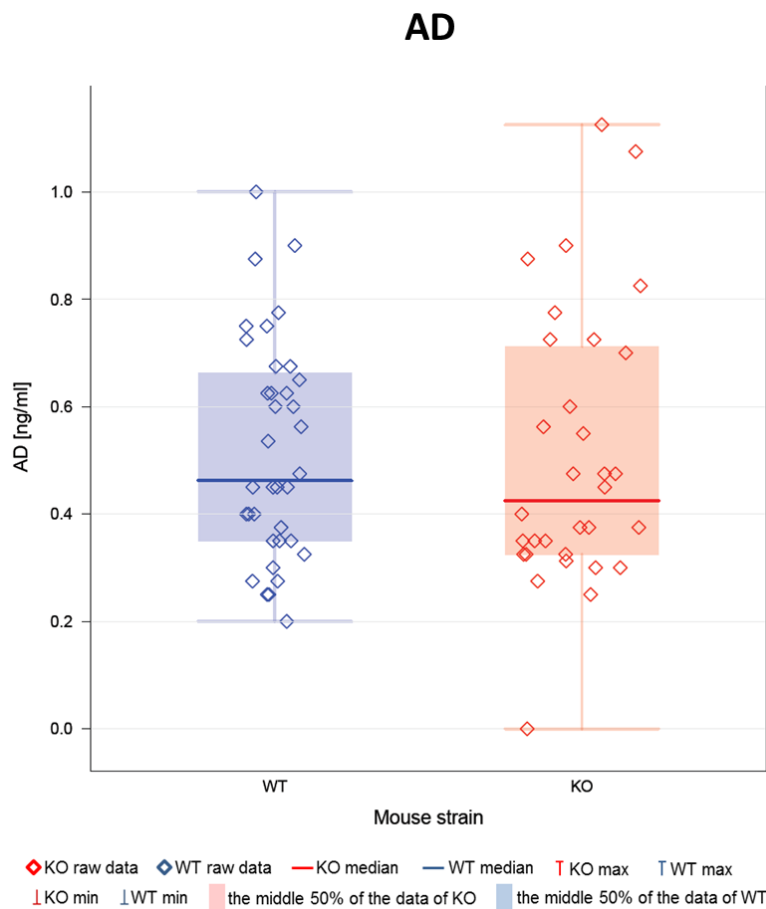
Dabei war der Testosteronwert der Knockout-Mäuse (KO) im Vergleich zu den Kontrollmäusen (WT) signifikant reduziert ( $p=0,0315$ ) (Abb. 41). Die Analyse des AD-Wertes (5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol), ein Abfallprodukt des Testosteronmetabolismus, zeigte ebenfalls eine Reduzierung in KO-Mäusen, die jedoch nicht signifikant ausfiel ( $p=0,8977$ ) (Abb. 42). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Testosteron und AD zeigten die Werte des Corticosterons in KO-Mäusen einen hochsignifikanten Anstieg im Vergleich zu den Kontrollmäusen ( $p=0,0006$ ) (Abb. 43).



**Abb. 41: Vergleich der Testosteronwerte**

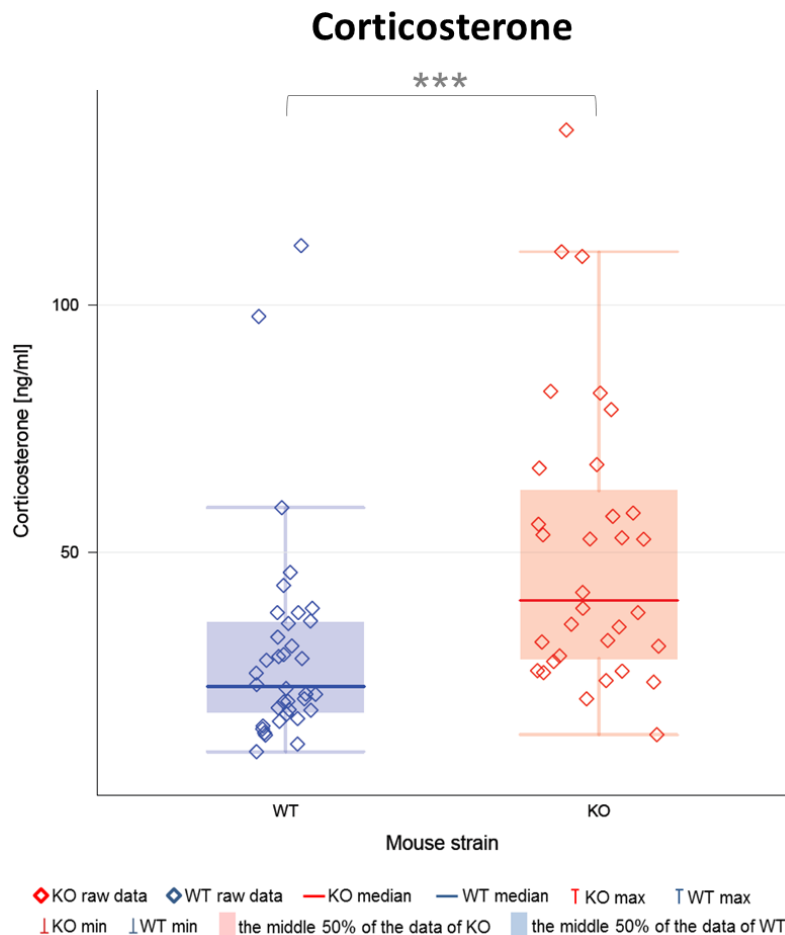
KO-Mäuse (rot) zeigten signifikant reduzierte Testosteronwerte im Vergleich zu WT-Mäusen (blau).  
(\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

(Abbildung siehe Seite 70)



**Abb. 42: Vergleich der AD-Werte**

KO-Mäuse (rot) zeigten nicht signifikant reduzierte AD-Werte im Vergleich zu WT-Mäusen (blau).  
(\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )



**Abb. 43: Vergleich der Corticosteronwerte**

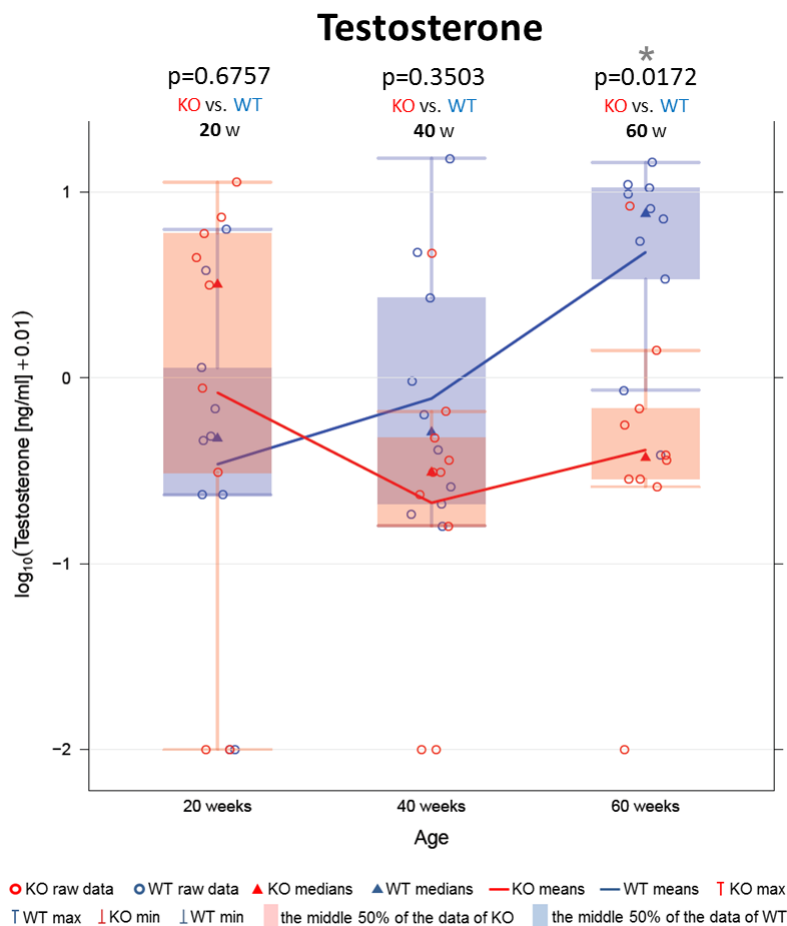
KO-Mäuse (rot) zeigten signifikant erhöhte Corticosteronwerte im Vergleich zu WT-Mäusen (blau). (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

### 5.1.2 Testosteron, AD und Corticosteron – Aufteilung in einzelne Altersgruppen

Um weitere Informationen über diese Steroidhormone in einzelnen Altersgruppen zu erlangen, wurden Serumproben von Mäusen im Alter von 20, 40 und 60 Wochen untersucht und jeweils die Werte von KO-Mäusen mit denen gleichaltriger WT-Mäuse verglichen (Abb. 44).

Dabei wurden in 20 Wochen alten Tieren niedrigere Testosteronwerte in WT-Mäusen festgestellt als in KO-Mäusen, was jedoch nicht signifikant war ( $p = 0,6757$ ). In der nächsten Altersgruppe von 40 Wochen sind bei den KO-Mäusen die Werte abgefallen während sie bei den WT-Mäusen im gleichen Maße angestiegen sind, sodass hier ein

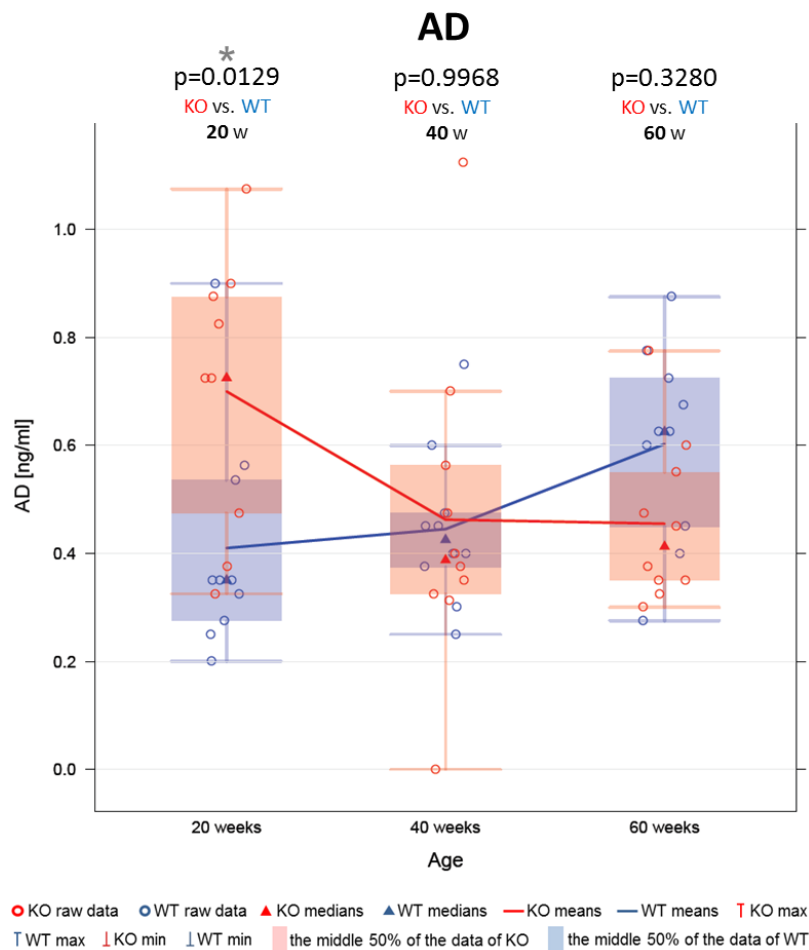
(nicht signifikanter) Unterschied ( $p=0,3503$ ) zugunsten der WT-Mäuse zu verzeichnen war. Anschließend blieben die Werte der KO-Mäuse weiterhin niedrig, während die der WT-Mäuse stark anstiegen und somit in der 60-Wochen-Gruppe in einem signifikanten Unterschied ( $p=0,0172$ ) resultierten.



**Abb. 44: Vergleich der Testosteronwerte im Alter von 20, 40 und 60 Wochen**

KO-Mäuse (rot) zeigten erniedrigte Testosteronwerte im Alter von 40 und signifikant erniedrigte Werte im Alter von 60 Wochen im Vergleich zu WT-Mäusen (blau). (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ )

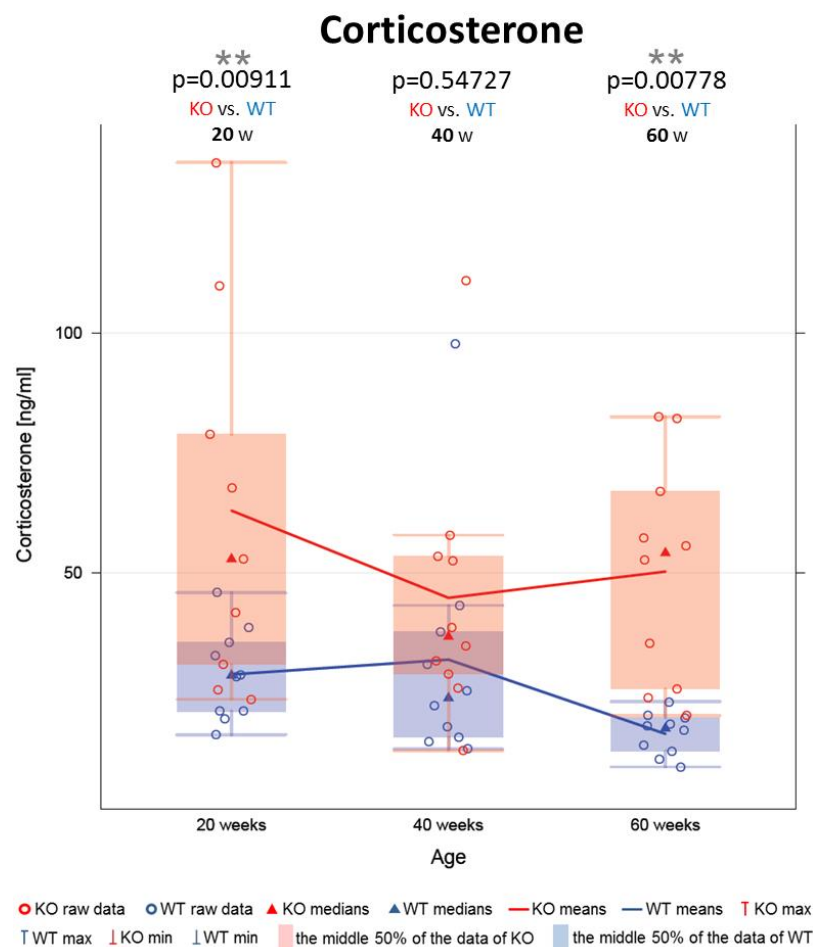
Die altersabhängige Auswertung der AD-Werte (Abb. 45) zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die der Testosteronwerte, jedoch um eine Altersstufe nach rechts verschoben. So waren die AD-Werte der 20 Wochen alten KO-Mäuse signifikant höher als die der WT-Mäuse ( $p=0,0129$ ), was sich erst in der Altersgruppe der 40 Wochen alten Tiere änderte ( $p=0,9968$ ). In der 60-Wochen-Gruppe wiesen die KO-Mäuse deutlich niedrigere AD-Werte auf als die WT-Mäuse, der Unterschied blieb jedoch unter signifikantem Niveau ( $p=0,3280$ ).



**Abb. 45: Vergleich der AD-Werte im Alter von 20, 40 und 60 Wochen**

KO-Mäuse (rot) zeigten erniedrigte AD-Werte im Alter von 60 Wochen auf und signifikant erhöhte Werte im Alter von 20 Wochen im Vergleich zu WT-Mäusen (blau). (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

Bei der Auswertung der Corticosteronwerte (Abb. 46) wurden bereits in der 20-Wochen-Gruppe stark erhöhte Werte bei KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen festgestellt, was einen hochsignifikanten Unterschied ( $p = 0,00911$ ) darstellte, während es im Alter von 40 Wochen zwischen den Werten von KO- und WT-Mäusen zu einer leichten Annäherung ( $p = 0,54727$ ) kam. Bei 60 Wochen alten KO-Mäusen stiegen die Corticosteronlevel wieder leicht an, während sie bei den gleichaltrigen WT-Mäusen auf ein sehr niedriges Niveau abfielen, was wiederum einen hochsignifikanten Unterschied ( $p = 0,00778$ ) zur Folge hatte.



**Abb. 46: Vergleich der Corticosteronwerte im Alter von 20, 40 und 60 Wochen**

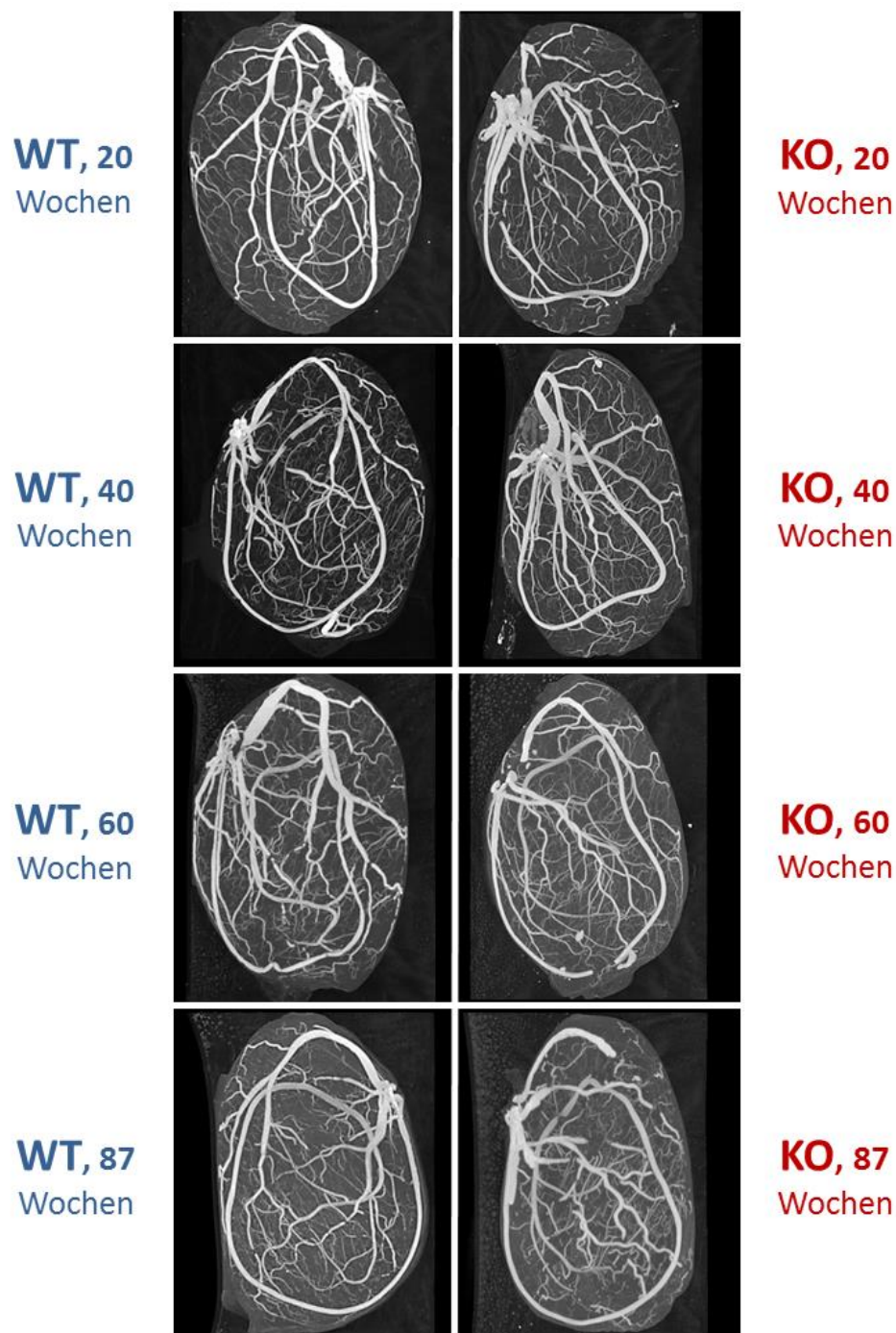
KO-Mäuse (rot) zeigten erhöhte Corticosteronwerte in allen drei Altersgruppen und jeweils hochsignifikant erhöhte Werte im Alter von 20 und 60 Wochen im Vergleich zu WT-Mäusen (blau). (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

Der Vergleich der Altersgruppen untereinander, wenn man die Zugehörigkeit zur KO- oder WT-Gruppe unberücksichtigt ließe, ergab keinen signifikanten Unterschied in den Werten von Testosteron ( $p = 0,1071$ ), AD ( $p = 0,3481$ ) und Corticosteron ( $p = 0,3225$ ).



## 5.2 Ergebnisse der MikroCT-Untersuchungen

Von allen Mäusen wurde jeweils ein Kontrastmittel-perfundierter Hoden im Mikro-Computertomographen untersucht (Abb. 47) und Hodenvolumen (Testis volume) und Gefäßvolumen (Vessel volume) der größeren Gefäße (also nicht der Kapillaren) bestimmt.

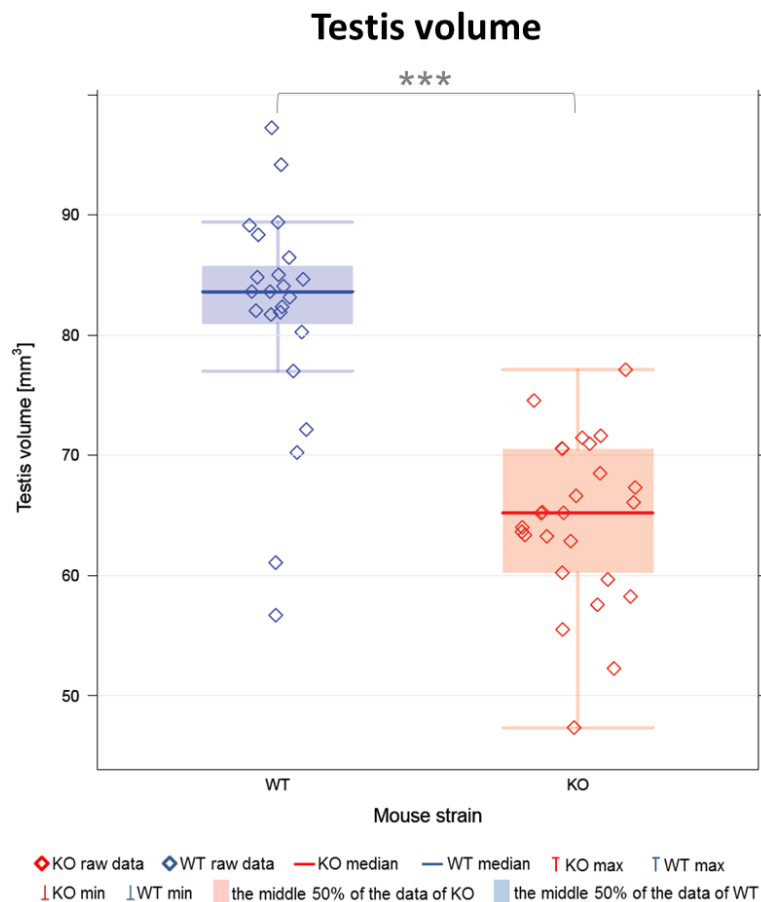


**Abb. 47: Exemplare von MikroCT-Aufnahmen der Hoden**

Auf der linken Seite sind Beispielbilder von Hoden der Kontrollmäuse (WT) im Alter von 20, 40, 60 und 87 Wochen abgebildet, auf der rechten Seite Bilder von Hoden der Knockout-Mäuse (KO) im gleichen Alter.

### 5.2.1 Hodenvolumen (Testis volume)

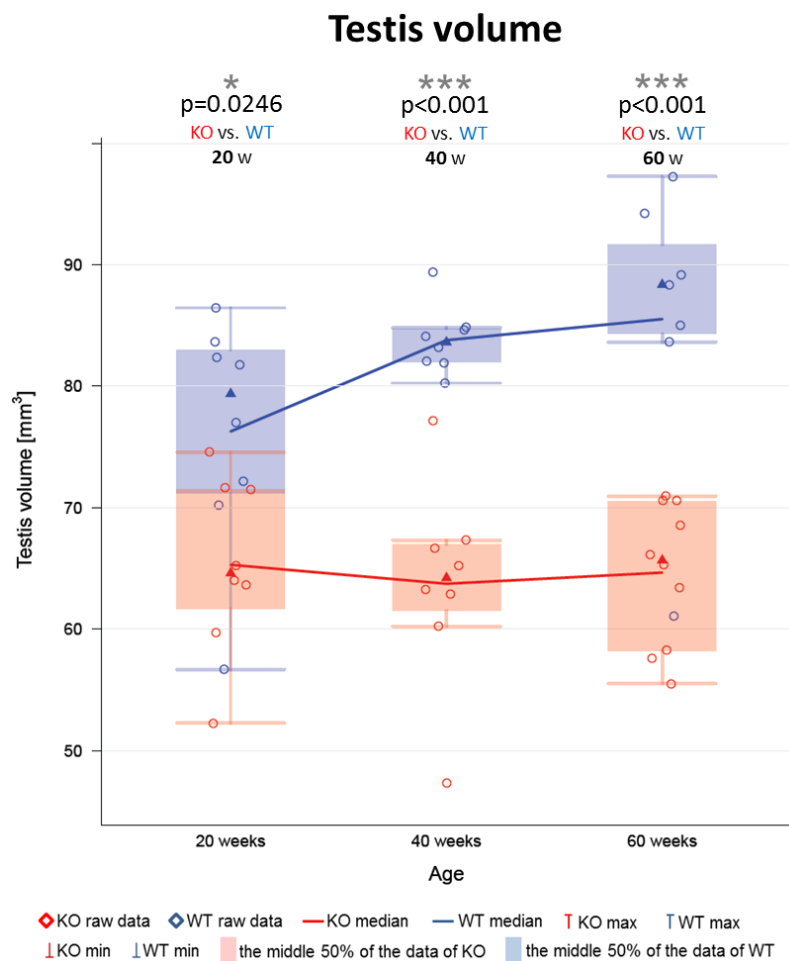
Das mittels MikroCT ermittelte Volumen der kontrastierten Hoden zeigte eine signifikante Reduzierung bei den Knockout-Mäusen (KO) im Vergleich zu den Kontrollmäusen (WT) ( $***p<0,001$ ) (Abb. 48).



**Abb. 48: Vergleich der Hodenvolumina**

KO-Mäuse (rot) zeigten ein signifikant reduziertes Hodenvolumen im Vergleich zu WT-Mäusen (blau). ( $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$ ;  $***p<0,001$ )

Das Hodenvolumen der KO-Mäuse zeigte in verschiedenen Altersgruppen (20, 40 und 60 Wochen) ein konstant niedriges Niveau im Vergleich zu den WT-Mäusen, die ein kontinuierlich hohes Niveau aufwiesen, was zu signifikanten Unterschieden in allen Altersgruppen führte (Abb. 49). Obwohl der Unterschied im Alter von 20 Wochen bereits signifikant war ( $p=0,0246$ ), verringerten sich die Werte der KO-Mäuse leicht während die der WT-Mäuse weiter anstiegen, sodass der Unterschied zwischen KO- und WT-Mäusen im Alter von 40 und 60 Wochen jeweils hochsignifikant ( $***p<0,001$ ) ausfiel.



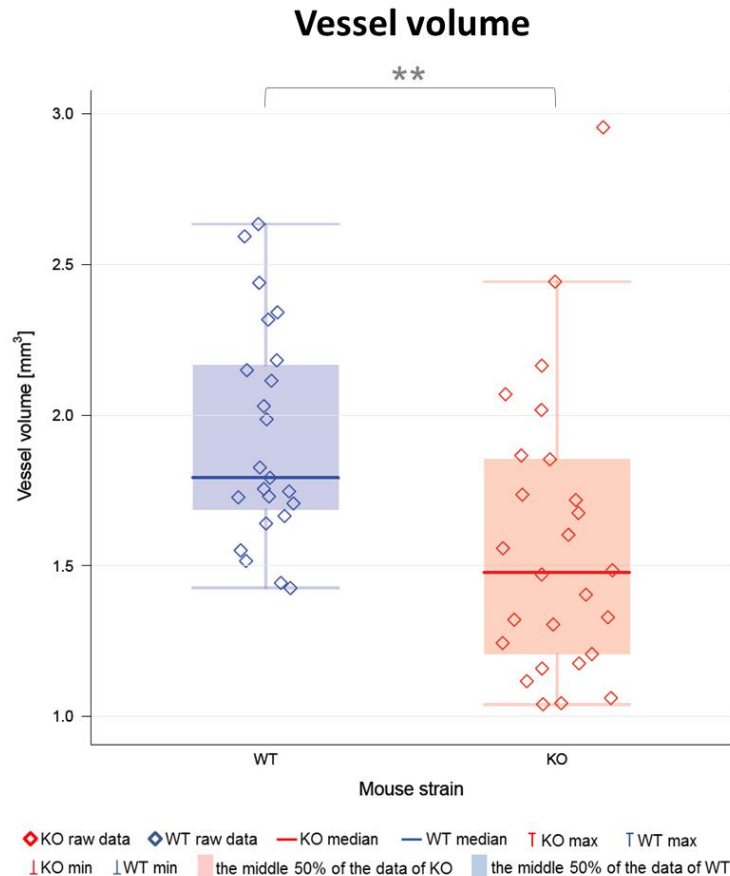
**Abb. 49: Vergleich der Hodenvolumina im Alter von 20, 40 und 60 Wochen**

KO-Mäuse (rot) zeigten signifikant reduzierte Hodenvolumina in allen drei Altersgruppen und jeweils hochsignifikant reduzierte Werte im Alter von 40 und 60 Wochen im Vergleich zu WT-Mäusen (blau). (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

Der Vergleich der Altersgruppen untereinander, wenn man die Zugehörigkeit zur KO- oder WT-Gruppe unberücksichtigt ließe, ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,5294$ ) in Bezug auf das Hodenvolumen.

### 5.2.2 Gefäßvolumen (Vessel volume)

Mit Hilfe von MikroCT-Untersuchungen wurde das Volumen der mit Kontrastmittel perfundierten Gefäße der Hoden ermittelt. Dabei wurde eine signifikante Reduzierung bei den Knockout-Mäusen (KO) im Vergleich zu den Kontrollmäusen (WT) ( $p=0,0041$ ) festgestellt (Abb. 50).

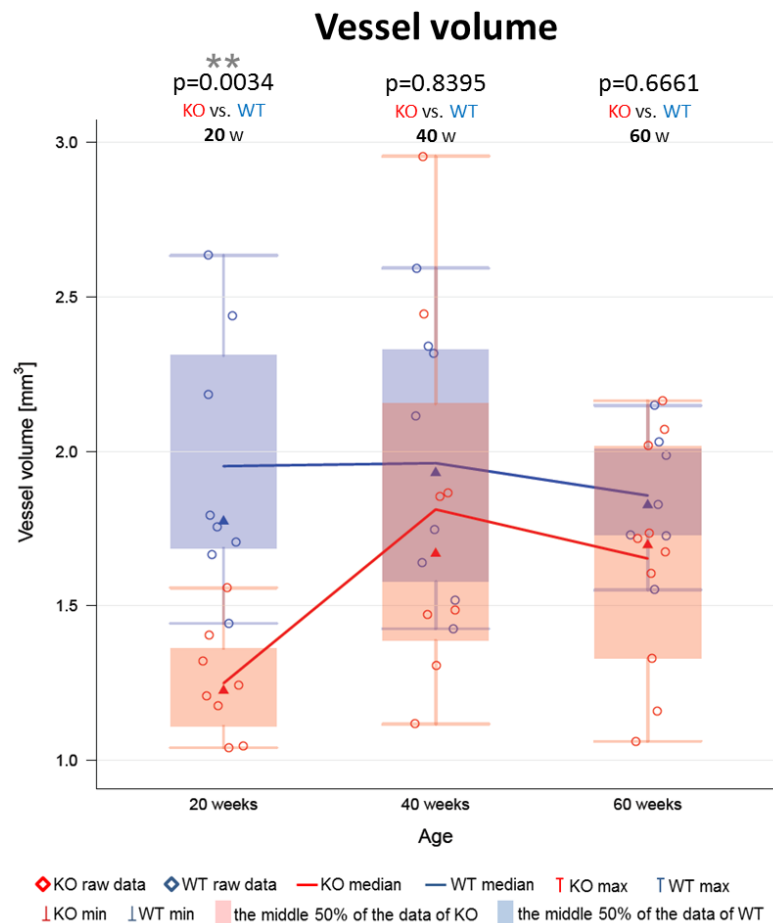


**Abb. 50: Vergleich der Gefäßvolumina**

KO-Mäuse (rot) zeigten hochsignifikant reduzierte Gefäßvolumina im Vergleich zu WT-Mäusen (blau). (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ )

Die Analyse der Werte der Gefäßvolumina (Abb. 51) zeigte einen hohen Wert in WT- und einen sehr niedrigen in KO-Mäusen im Alter von 20 Wochen, sodass der Unterschied in dieser Altersgruppe hochsignifikant ausfiel ( $p=0,0034$ ). In der nächsten Altersgruppe blieben die Werte der WT-Mäuse auf nahezu gleichem Niveau wie zuvor, während die der

KO-Mäuse steil anstiegen, wodurch die Differenz zwischen ihnen im Alter von 40 Wochen keine Signifikanz mehr aufwies ( $p=0,8395$ ). Im Alter von 60 Wochen fielen die der Gefäßvolumina beider Mauslinien um fast den gleichen Wert ab, sodass der Unterschied zwischen KO- und WT-Mäusen in diesem Alter nicht wesentlich höher war ( $p=0,6661$ ) als in der Altersgruppe zuvor.



**Abb. 51: Vergleich der Gefäßvolumina im Alter von 20, 40 und 60 Wochen**

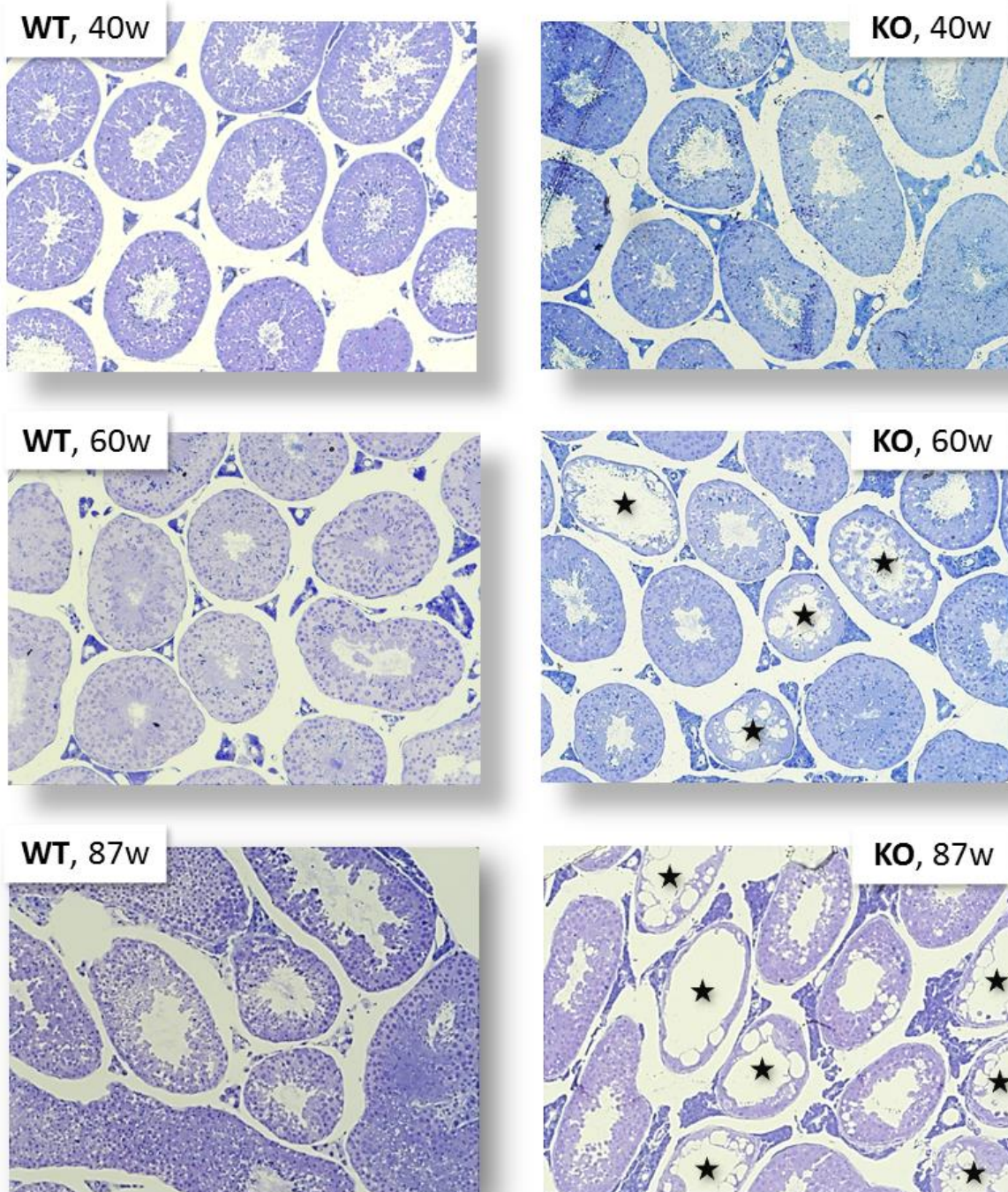
KO-Mäuse (rot) zeigten reduzierte Gefäßvolumina in allen drei Altersgruppen, jedoch nur in der niedrigsten Altersgruppe auf hochsignifikantem Niveau im Vergleich zu WT-Mäusen (blau). (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ )

Auch hier ergab der Vergleich der Altersgruppen untereinander, wenn man die Zugehörigkeit zur KO- oder WT-Gruppe unberücksichtigt ließe, keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,1451$ ).



### 5.3 Ergebnisse der stereologischen Untersuchungen

Von allen Mäusen wurden Semidünnschnitte (Abb. 52) von jeweils einem Glutaraldehyd-perfundierte Hoden untersucht und die Kapillarparameter (Kapillarlänge, -volumen und -oberfläche) bestimmt.



**Abb. 52: Bildausschnitte von Semidünnschnitten der Hoden**

Links sind Bildausschnitte von Hoden der Kontrollmäuse (WT) im Alter von 40, 60 und 87 Wochen (40w, 60w, 87w) abgebildet, rechts Bildausschnitte von Hoden der Knockout-Mäuse (KO) im gleichen Alter. Bei den KO-Mäusen im Alter von 60 und 87 Wochen sind bereits Tubuli mit gestörtem Keimepithel zu beobachten (★). (Vergrößerung: Ok.10, Obj.20)

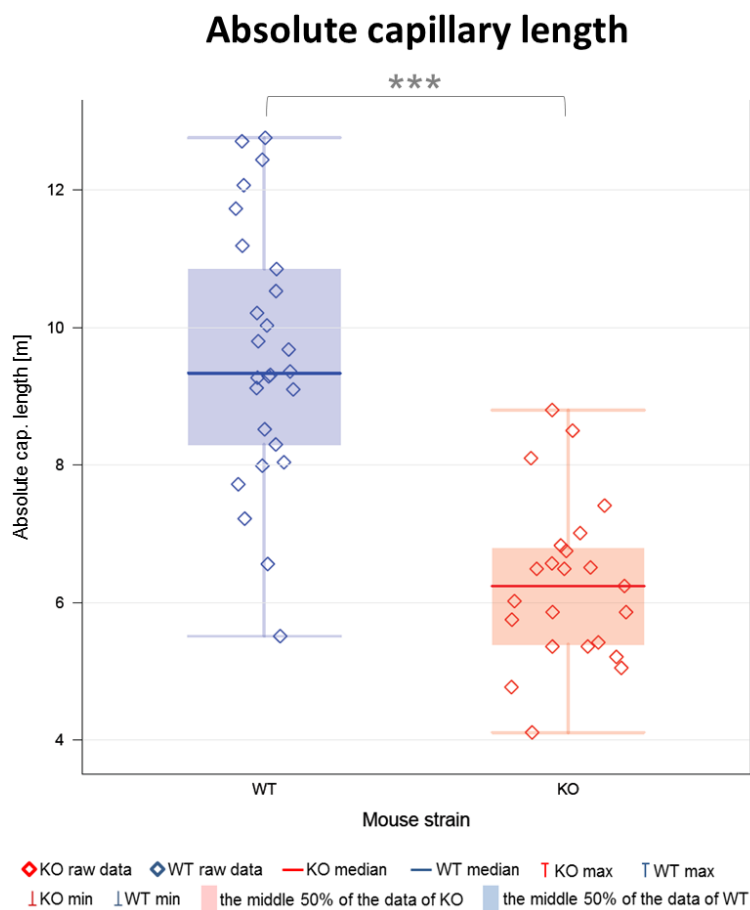


### 5.3.1 Absolute Kapillarparameter

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der MikroCT-Untersuchungen der größeren Gefäße, wiesen die Knockout-Mäuse (KO) in allen absoluten Kapillarparametern (absolute kapilläre Länge, Volumen und Oberfläche) signifikant reduzierte Werte auf.

#### 5.3.1.1 Absolute Kapillarlänge

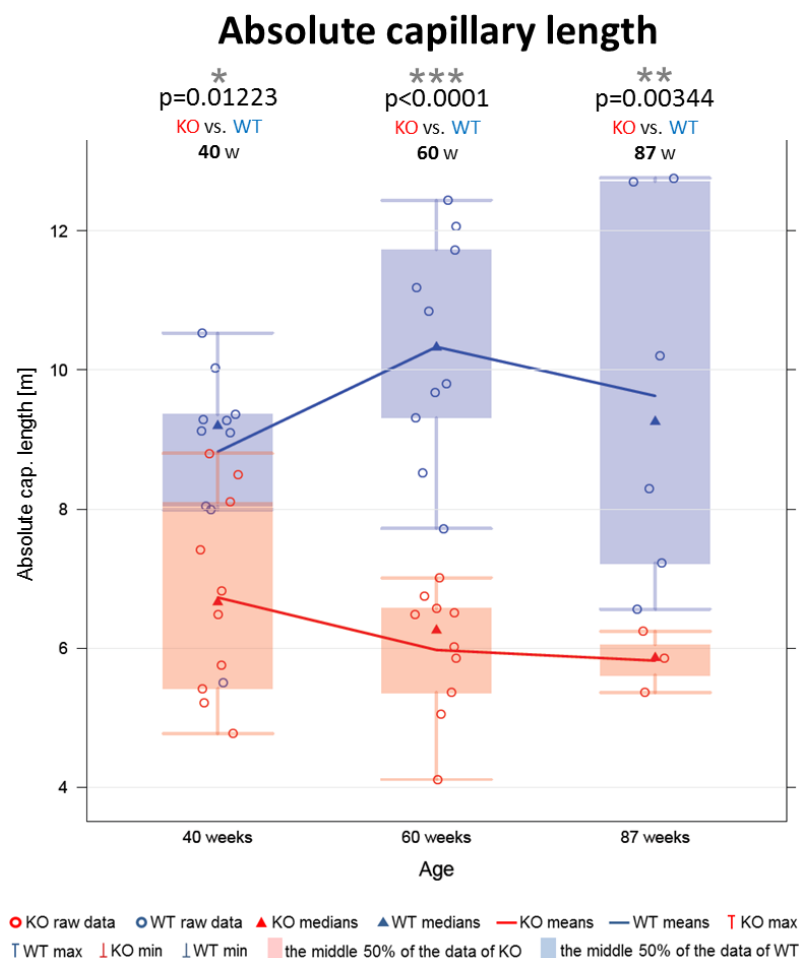
Die Reduzierung der absoluten Kapillarlänge in KO- im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen war hochsignifikant ( $***p<0,001$ ) (Abb. 53).



**Abb. 53: Vergleich der absoluten Kapillarlänge**

KO-Mäuse (rot) zeigten hochsignifikant reduzierte absolute Kapillarlängen im Vergleich zu WT-Mäusen (blau). ( $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$ ;  $***p<0,001$ )

Bei der Untersuchung der absoluten Kapillarlänge in den verschiedenen Altersgruppen (40-, 60- und 87 Wochen) (Abb. 54), zeigten die KO-Mäuse zu allen drei Zeitpunkten signifikante Unterschiede im Vergleich zu den gleichaltrigen WT-Mäusen. In der 40-Wochen-Gruppe war bereits ein signifikanter Unterschied festzustellen ( $p=0,01223$ ), der in der 60-Wochen-Gruppe hochsignifikant wurde ( $***p<0,0001$ ), da die Werte von KO- und WT-Mäusen weiter auseinandergingen. Bei den 60 Wochen alten WT-Mäusen nahm die absolute Kapillarlänge leicht ab, während die der KO-Mäuse auf sehr niedrigem Niveau verharrete, wodurch der Unterschied hochsignifikant blieb ( $p=0,00344$ ).



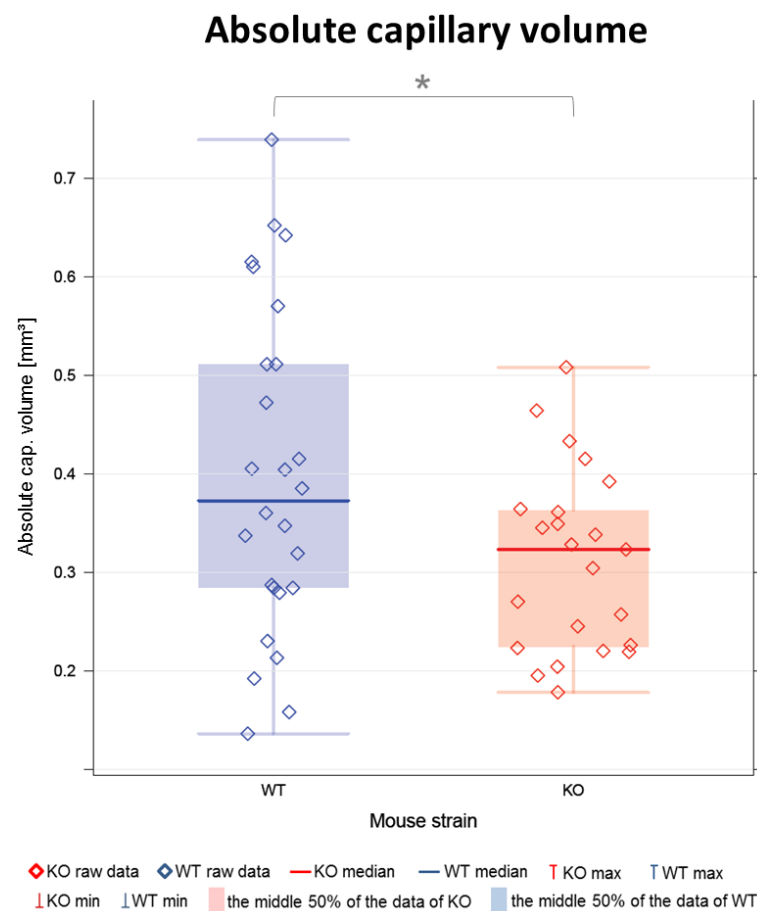
**Abb. 54: Vergleich der absoluten Kapillarlänge im Alter von 40, 60 und 87 Wochen**

KO-Mäuse (rot) zeigten signifikant reduzierte absolute Kapillarlängen in allen drei Altersgruppen und jeweils hochsignifikant reduzierte Werte im Alter von 60 und 87 Wochen im Vergleich zu WT-Mäusen (blau). (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ )

Der Vergleich der Altersgruppen untereinander, wenn man die Zugehörigkeit zur KO- oder WT-Gruppe unberücksichtigt ließe, ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,5901$ ).

### 5.3.1.2 Absolutes Kapillarvolumen

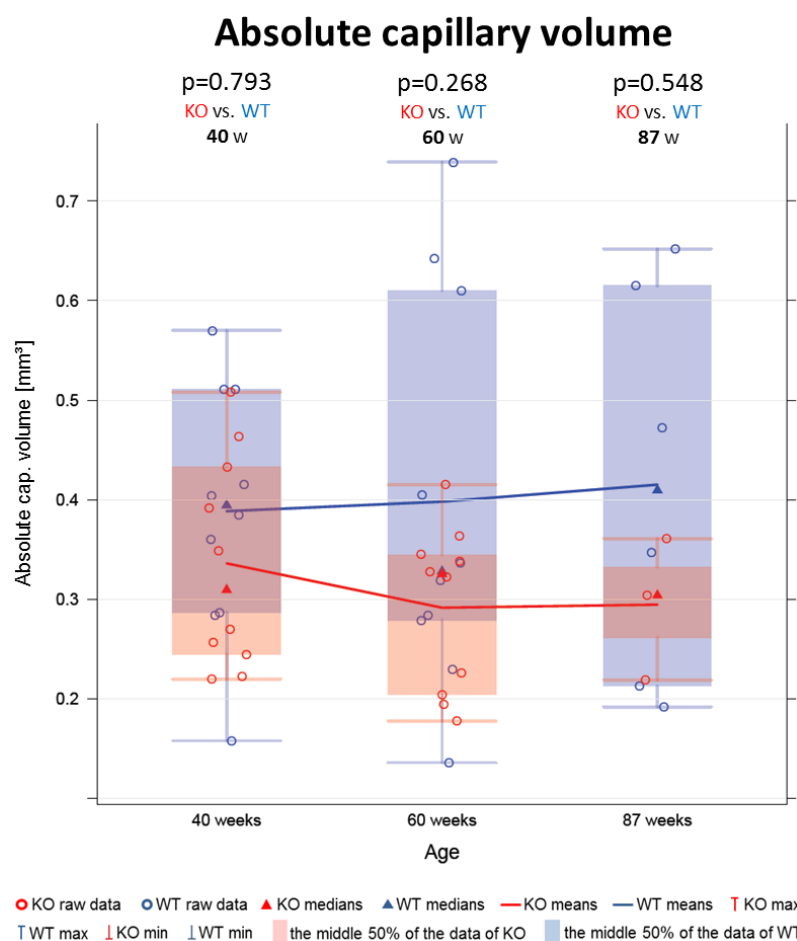
Im Vergleich zur absoluten Kapillarlänge war der Unterschied zwischen KO- und WT-Mäusen beim absoluten Kapillarvolumen weniger extrem, aber dennoch signifikant ( $p=0,0409$ ) (Abb. 55).



**Abb. 55: Vergleich des absoluten Kapillarvolumens**

KO-Mäuse (rot) zeigten signifikant reduzierte absolute Kapillarvolumina im Vergleich zu WT-Mäusen (blau). (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ )

In den verschiedenen Altersgruppen (40-, 60- und 87 Wochen) zeigte sich in keiner ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der absoluten Kapillarvolumina von KO- und WT-Mäusen (Abb. 56). Dennoch waren die Kapillarvolumina der KO-Mäuse in allen Altersgruppen reduziert im Vergleich zu den WT-Mäusen. So war in der 40-Wochen-Gruppe der Unterschied am geringsten ( $p=0,793$ ), stieg zum Zeitpunkt von 60 Wochen aber an ( $p=0,268$ ), da die Messwerte der KO-Mäuse absanken während die der WT-Mäuse konstant blieben. Die Werte der KO-Mäuse sanken im Alter von 87 Wochen nochmals leicht ab, jedoch blieb der Unterschied zwischen KO- und WT-Maus unter einem signifikanten Niveau ( $p=0,548$ ).



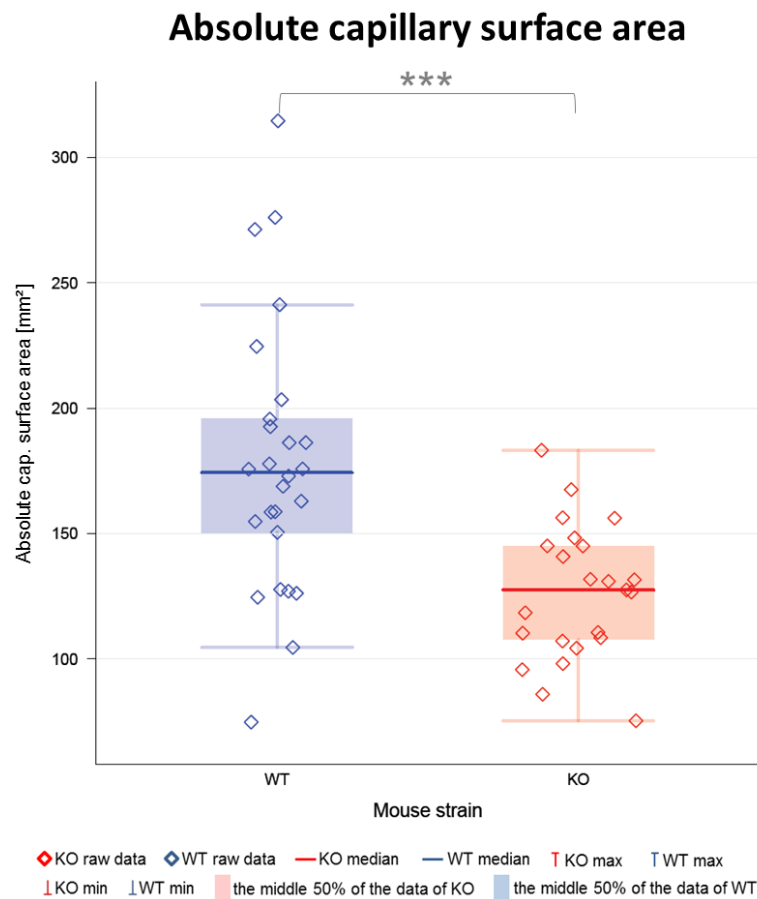
**Abb. 56: Vergleich des absoluten Kapillarvolumens im Alter von 40, 60 und 87 Wochen**

KO-Mäuse (rot) zeigten reduzierte absolute Kapillarvolumina in allen drei Altersgruppen, jedoch jeweils unter signifikantem Niveau, im Vergleich zu WT-Mäusen (blau). (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ )

Der Vergleich der Altersgruppen untereinander, wenn man die Zugehörigkeit zur KO- oder WT-Gruppe unberücksichtigt ließe, ergab hier ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,8530$ ).

### 5.3.1.3 Absolute Kapillaroberfläche

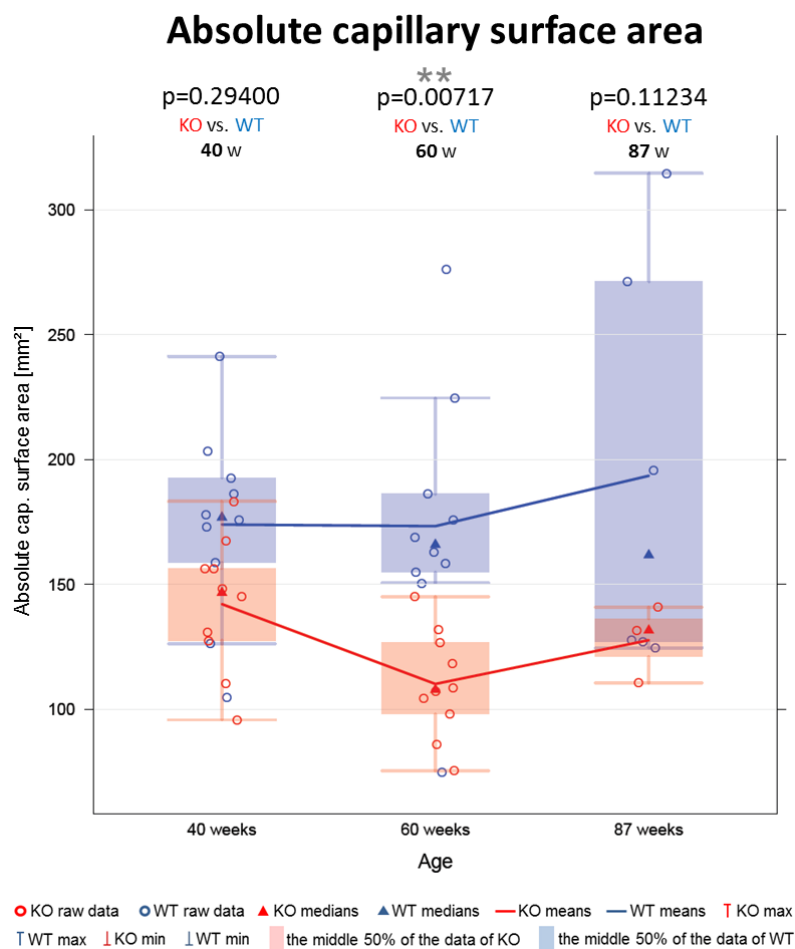
Wie bei der absoluten Kapillarlänge zeigte sich auch beim Vergleich der absoluten Kapillaroberfläche ein hochsignifikanter Unterschied ( $p=0,0002$ ) zwischen KO- und WT-Mäusen (Abb. 57).



**Abb. 57: Vergleich der absoluten Kapillaroberfläche**

KO-Mäuse (rot) zeigten hochsignifikant reduzierte absolute Kapillaroberflächen im Vergleich zu WT-Mäusen (blau). (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ )

Ähnlich wie beim absoluten Kapillarovolumen zeigte sich auch bei der absoluten Kapillaroberfläche (Abb. 58) nur ein geringer Unterschied zwischen den Werten von KO- und WT-Mäusen im Alter von 40 Wochen ( $p=0,29400$ ). Dieser wurde jedoch in der 60-Wochen-Gruppe hochsignifikant ( $p=0,00717$ ), da – während die Messwerte der WT-Mäuse auf dem vorherigen Level verblieben – die Werte der KO-Mäuse steil abfielen. In der Altersgruppe der 87 Wochen alten Tiere zeigten sowohl KO- wie auch WT-Mäuse einen leichten Anstieg der Werte, sodass der Unterschied zwar noch recht hoch ausfiel, aber dennoch unter einem signifikanten Niveau verblieb ( $p=0,11234$ ).



**Abb. 58: Vergleich der absoluten Kapillaroberfläche im Alter von 40, 60 und 87 Wochen**

KO-Mäuse (rot) zeigten reduzierte absolute Kapillaroberflächen in allen drei Altersgruppen im Vergleich zu WT-Mäusen (blau). Dabei ist der Unterschied in der mittleren Altersgruppe (60 Wochen) hochsignifikant, in den beiden anderen (40- und 87 Wochen) unter einem signifikanten Niveau. (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ )

Auch hier ergab der Vergleich der Altersgruppen untereinander, wenn man die Zugehörigkeit zur KO- oder WT-Gruppe unberücksichtigt ließe, keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,2154$ ).



## 5.3.2 Die Kapillarparameter in ihrer Gesamtheit

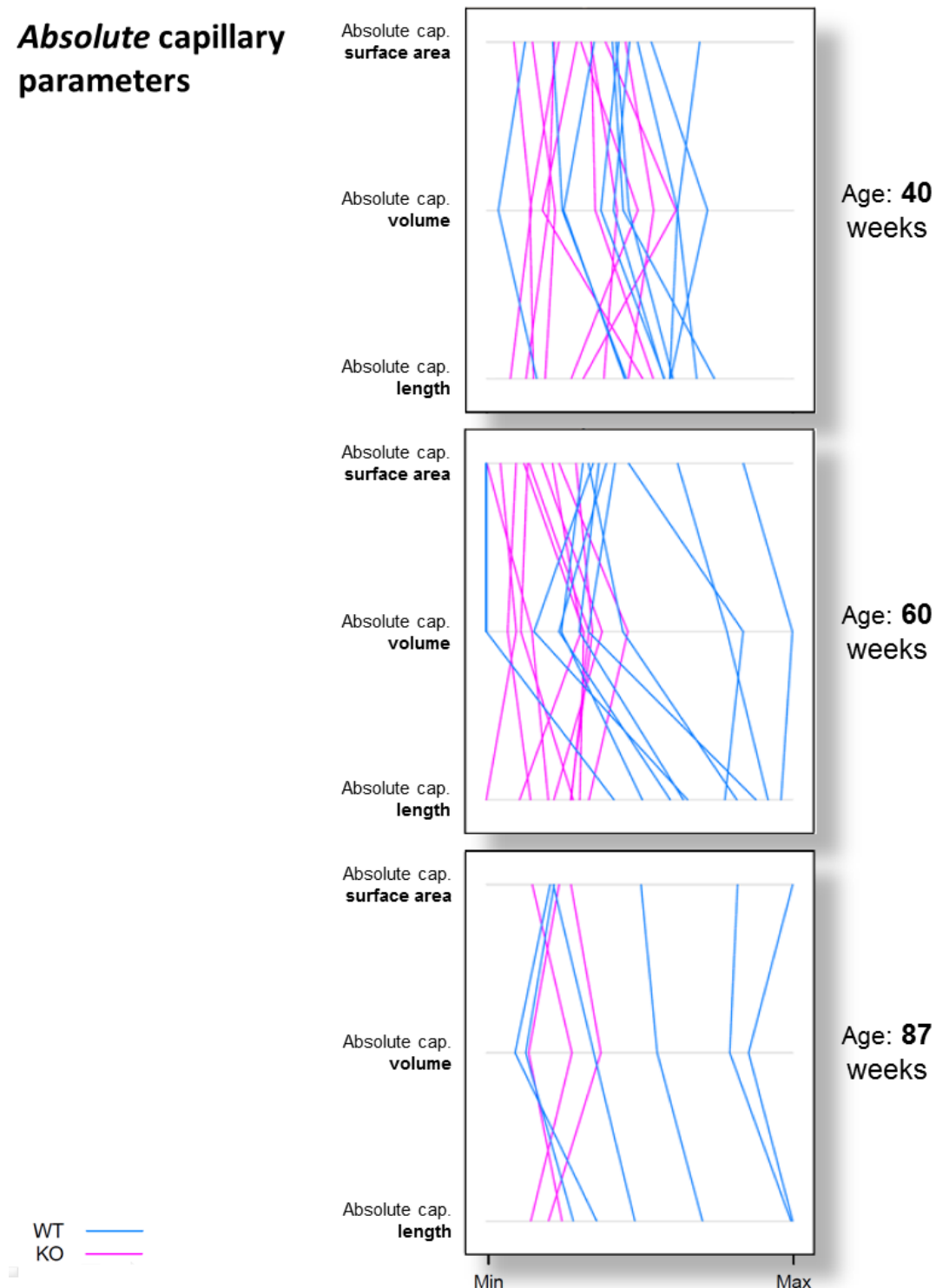
### 5.3.2.1 Parallelplots

Um Veränderungen der Kapillaren als morphologische Einheit unter Einbeziehung aller drei Parameter zusammen graphisch darstellen zu können, wurden die einzelnen Kapillarparameter (Kapillarlänge, -volumen, -oberfläche) mit Hilfe von Parallelplots (*Sarkar 2008*) zueinander ins Verhältnis gesetzt (Abb. 59, 60). Dabei wurde für jede Altersgruppe ein Schaubild erstellt, bei auf der y-Achse die drei Kapillarparameter ohne Einheiten ausgewiesen sind und die x-Achse mit „Minimum“ (Min) und „Maximum“ (Max) der jeweiligen Parameter skaliert ist. Für jeden Kapillarparameter ergibt sich somit jeweils ein Punkt, wodurch also pro Maus drei Punkte entstehen, die durch ein Liniensegment miteinander verbunden sind. Dabei sind für KO-Mäuse die Liniensegmente rot, für WT-Mäuse blau markiert.

Durch die Parallelplots werden die multivariate Struktur und die Abhängigkeit der Kombination der drei verschiedenen Komponenten untereinander dargestellt und Unterschiede zwischen den Verteilungsmustern von KO und WT in der Gesamtheit ihrer Kapillarparameter sichtbar gemacht.

Dabei zeigte sich in der Darstellung der *absoluten* Kapillarparameter in ihrer Gesamtheit (Abb. 59), dass in allen drei Altersgruppen die KO-Mäuse eindeutig zu niedrigeren Werten tendierten als die WT-Mäuse (MANOVA \*\*\* $p < 0,0001$ ), die wiederum in allen drei Altersgruppen eine recht gleichmäßige Streuung in ihren Werten aufwiesen. Zeigte sich im Alter von 40 Wochen noch eine relativ gute Durchmischung der Verteilungsmuster von KO und WT in den mittleren Wertebereichen der jeweiligen Kapillarparameter, so war die der KO-Mäuse im Alter von 60 Wochen bereits deutlich nach links in Richtung der jeweiligen Minima verschoben. Im Alter von 87 Wochen sind außerhalb der niedrigsten Wertebereiche keine Messwerte von KO-Mäusen mehr zu finden.

## Absolute capillary parameters



**Abb. 59: Vergleich der Gesamtheit aller absoluten Kapillarparameter**

Um innerhalb der einzelnen Altersgruppen (40, 60 und 87 Wochen) die Unterschiede zwischen den Verteilungsmustern von KO (rot) und WT (blau) in der Gesamtheit ihrer absoluten Kapillarparameter (absolute Kapillarlänge, -volumen, -oberfläche) darstellen zu können, wurden diese jeweils mit einem Liniensegment verbunden (also ein Liniensegment pro Maus) und die x-Achse mit „minimum“ (Min) und „maximum“ (Max) der jeweiligen Kapillarparameter skaliert.

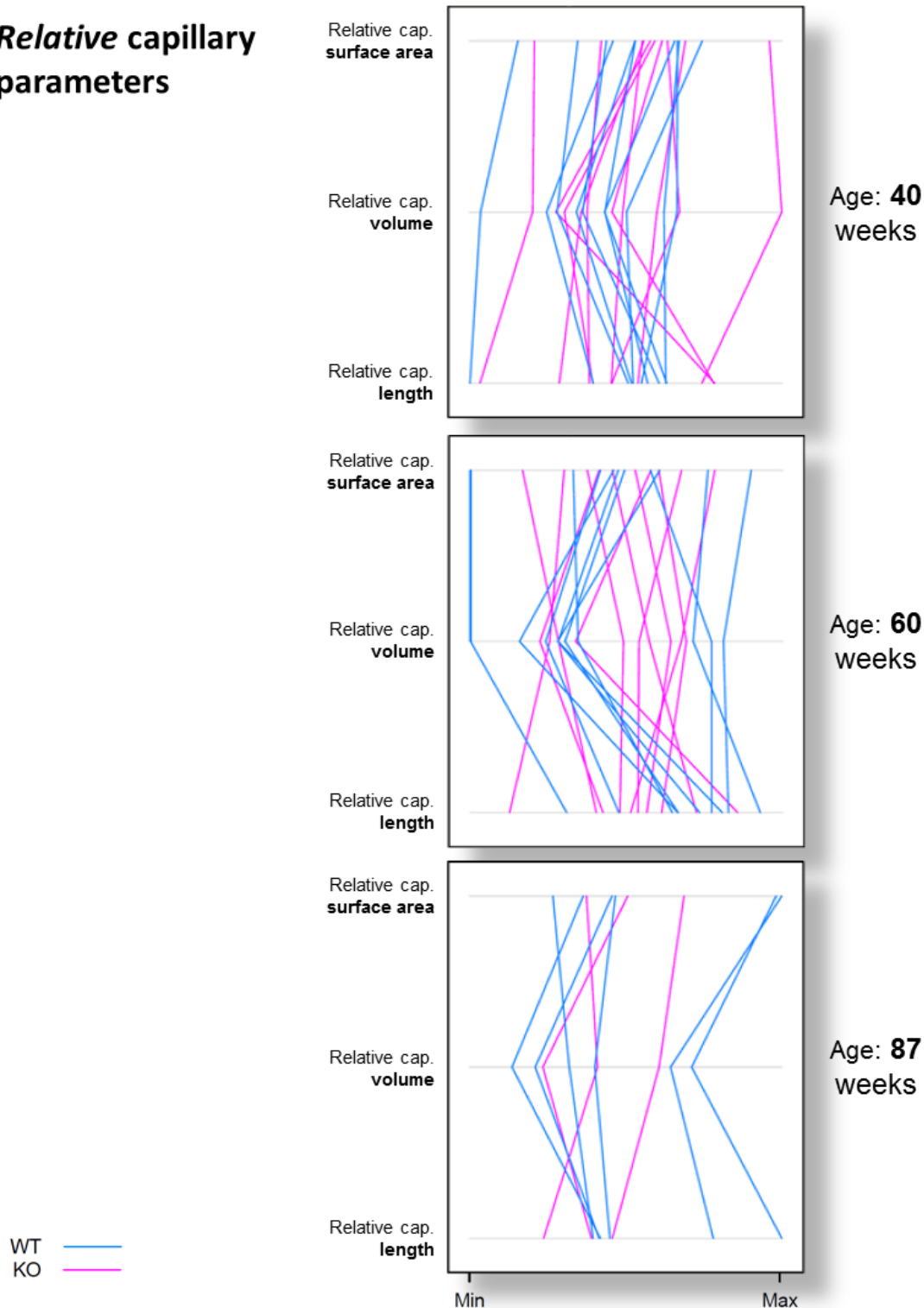
Dabei tendierten in allen drei Altersgruppen die KO-Mäuse eindeutig zu niedrigeren Werten als die WT-Mäuse, wobei die Ausprägung dieser Tendenz mit dem Alter zunahm.

Um weitere Informationen bezüglich der jeweiligen Kapillardichte zu erhalten, wurden die Messwerte der Kapillarparameter ins Verhältnis zum jeweiligen Hodenvolumen gesetzt. Dabei wiesen die einzelnen Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen KO- und WT-Mäusen auf (relative Kapillarlänge  $p=0,0824$ ; relatives Kapillarvolumen  $p=0,2843$ ; relative Kapillaroberfläche  $p=0,8887$ ).

Somit war im Gegensatz zu den Darstellungen der absoluten Kapillarparameter in ihrer Gesamtheit, die Deutlichkeit der Unterschiede in den *relativen* Kapillarparametern visuell nicht eindeutig erkennbar, da hier die Tendenz der KO-Mäuse im Verteilungsmuster ihrer relativen Kapillarparameter zu niedrigen Werten zwar signifikant war, diese Signifikanz jedoch weniger stark ausgeprägt war als die der absoluten Kapillarparameter (MANOVA  $p=0,0194$ ).

So war bei dieser Darstellung bei den KO-Mäusen eine Linksverschiebung der Werte in Richtung der jeweiligen Minima zu verzeichnen, die im Alter von 60 und 87 Wochen noch die mittleren Wertebereiche umfasste und lediglich in den höheren Wertebereichen nicht mehr zu auffinden war (Abb. 60).

## Relative capillary parameters



**Abb. 60: Vergleich der Gesamtheit aller relativen Kapillarparameter**

Um innerhalb der einzelnen Altersgruppen (40, 60 und 87 Wochen) die Unterschiede zwischen den Verteilungsmustern von KO (rot) und WT (blau) in der Gesamtheit ihrer relativen Kapillarparameter (absolute Kapillarlänge, -volumen, -oberfläche) darstellen zu können, wurden diese jeweils mit einem Liniensegment verbunden (also ein Liniensegment pro Maus) und die x-Achse mit „minimum“ (Min) und „maximum“ (Max) der jeweiligen Kapillarparameter skaliert.

Dabei war die Tendenz der KO-Mäuse in der Verteilung ihrer relativen Kapillarparameter zu niedrigeren Werten weniger stark ausgeprägt als die der absoluten Kapillarparameter.

### 5.3.2.2 Dreidimensionale Datenverteilung

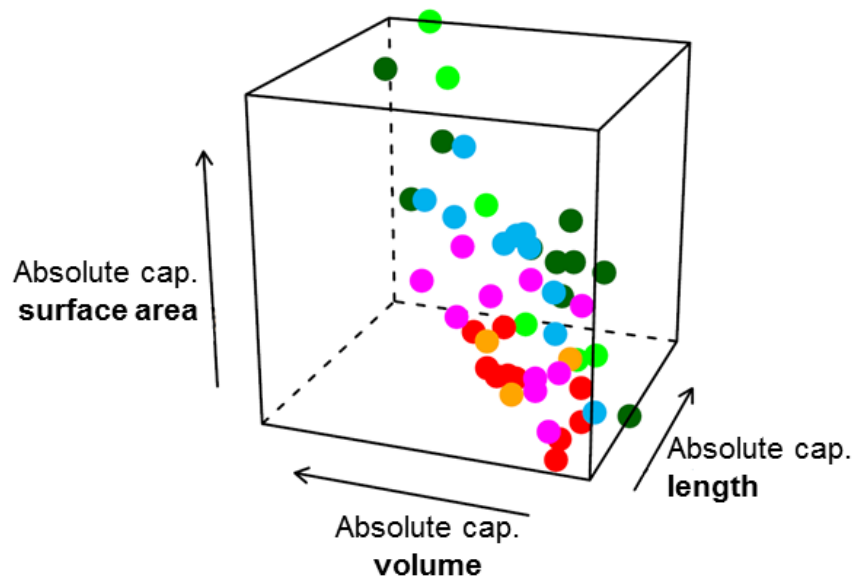
Um die tatsächliche Signifikanz besonders bei den relativen Kapillarparametern besser sichtbar machen zu können, wurde die Datenverteilung in einem dreidimensionalen Raum visuell dargestellt (Abb. 61, 62, 63).

Dabei sind die einzelnen Rohdaten als Punkte in einem dreidimensionalen Raum mit den drei Kapillarparametern (Kapillarlänge, -volumen und -oberfläche) als Achsen aufgezeichnet, die in ihrer Gesamtheit eine Punktwolke ergeben. Die einzelnen Altersgruppen und Mauslinien sind farblich kodiert. So sind die Punkte für die Daten der KO-Mäuse magenta (40 Wochen), rot (60 Wochen) und gelb (87 Wochen) eingefärbt, die Daten der WT-Mäuse cyan (40 Wochen), dunkelgrün (60 Wochen) und hellgrün (87 Wochen). Der dreidimensionale Raum ist in Form eines Würfels abgebildet, wobei die x-Achse die Kapillaroberfläche, die y-Achse die Kapillarlänge und die z-Achse das Kapillarovolumen darstellen (Abb. 61).

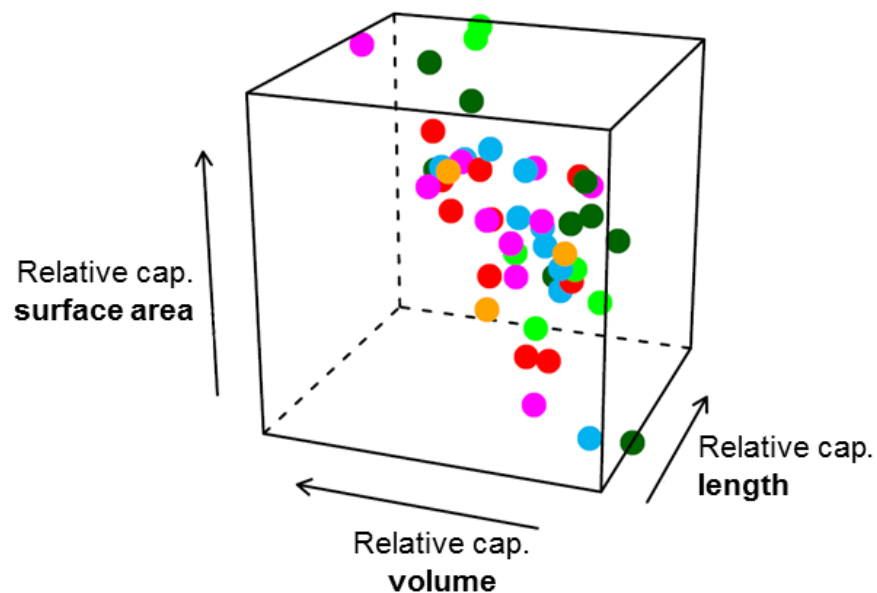
Auch in dieser graphischen Darstellung ließ sich bei den *absoluten* Kapillarparametern schon deutlich erkennen, dass die Schwerpunkte der Punktwolken eine eindeutige Tendenz aufwiesen. So lagen die blau-grün gehaltenen Punkte (WT) oben im hinteren linken Bereich des Würfels (höhere Werte), während die in Rottönen gehaltenen Punkte (KO) vorne unten rechts (niedrigere Werte) lokalisiert waren (Abb. 61 A).

Bei den *relativen* Kapillarparametern ergab sich ein ähnliches Verteilungsmuster der Daten, jedoch waren die Schwerpunkte der Punktwolken dichter am mittleren Bereich des dreidimensionalen Würfels orientiert (Abb. 61 B).

## A *Absolute capillary parameters*



## B *Relative capillary parameters*



WT, 40 weeks ● WT, 60 weeks ● WT, 87 weeks ●  
 KO, 40 weeks ● KO, 60 weeks ● KO, 87 weeks ●

**Abb. 61: Dreidimensionale Datenverteilung der Rohdaten**

Die Darstellung der Datenverteilung der Rohdaten von KO- (magenta, rot, gelb) und WT-Mäusen (cyan, dunkelgrün, hellgrün) in verschiedenen Altersgruppen zeigte bei den absoluten Kapillarparametern (A) eine Orientierung des Punktwolkenschwerpunktes der WT-Mäuse nach hinten oben links (höhere Werte) und der KO-Mäuse nach vorne unten rechts (niedrigere Werte), während bei den relativen Kapillarparametern (B) die gleiche Tendenz mit jeweiliger Orientierung zur Mitte hin vorlag.



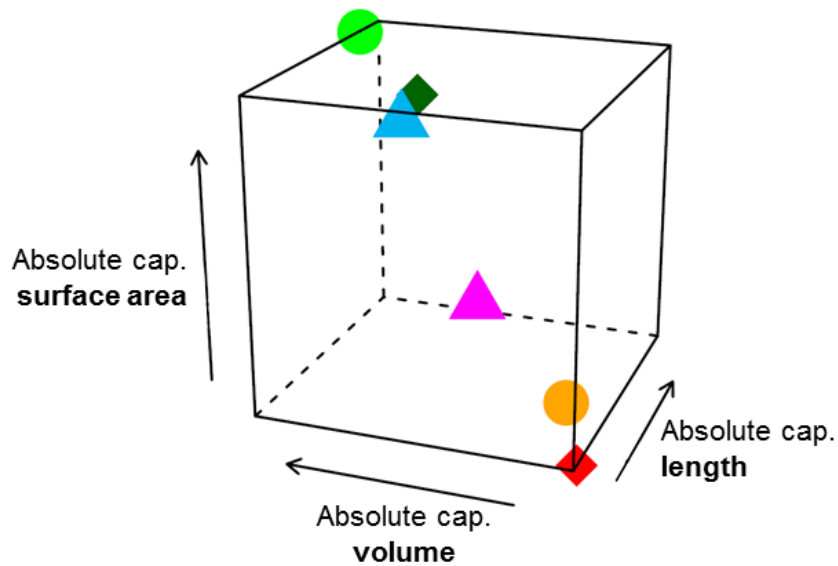
Um die Schwerpunkte der Lage einzelner Punktwolken zu verdeutlichen, wurden jeweils ihre arithmetischen Mittelwerte im dreidimensionalen Raum dargestellt (Abb. 62). Um auch die einzelnen Altersgruppen besser visuell miteinander vergleichen zu können, wurden – bei gleicher Farbkodierung wie zuvor – die Formen für jede Altersgruppe verändert. So ist nun die Altersgruppe der 40 Wochen alten Mäuse als Dreieck (cyan / magenta) und die Altersgruppe der 60 Wochen alten Mäuse als Raute (dunkelgrün / rot) dargestellt, während die 87-Wochen-Gruppe weiterhin als Kreis (hellgrün / gelb) bestehen bleibt.

Dabei zeigte sich bei den *absoluten* Kapillarparametern wieder deutlich, dass der Unterschied in der Gesamtheit aller absoluten Kapillarparameter in der 60- und 87-Wochen-Altersgruppe größer ausfiel als in der 40-Wochen-Gruppe (die Dreiecke liegen näher aneinander) (Abb. 62 A).

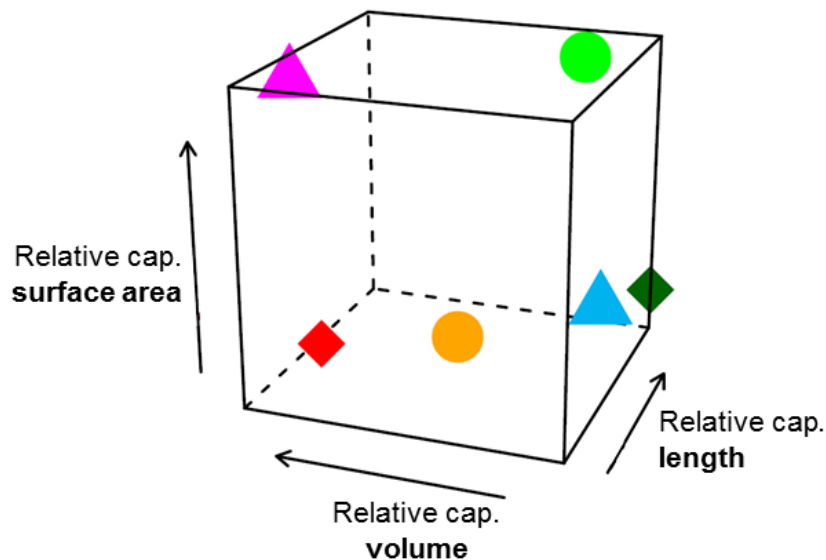
Bei den *relativen* Kapillarparametern waren durch Überlagerung der Punktwolkenschwerpunkte in der dritten Dimension die Unterschiede zwischen KO und WT auch in den einzelnen Altersgruppen visuell schwieriger zu erfassen (Abb. 62 B).

Wurde der Würfel jedoch um seine vertikale Achse gedreht, sodass sich der gesamte dreidimensionale Raum aus einem anderen Blickwinkel betrachten ließ, war erkennbar, dass die Schwerpunkte der einzelnen Punktwolken in der dritten Dimension weit auseinanderlagen und sich somit der signifikante Unterschied zwischen KO- und WT-Mäusen in der Gesamtheit aller relativen Kapillarparameter darstellen ließ (Abb. 63).

## A Absolute capillary parameters



## B Relative capillary parameters

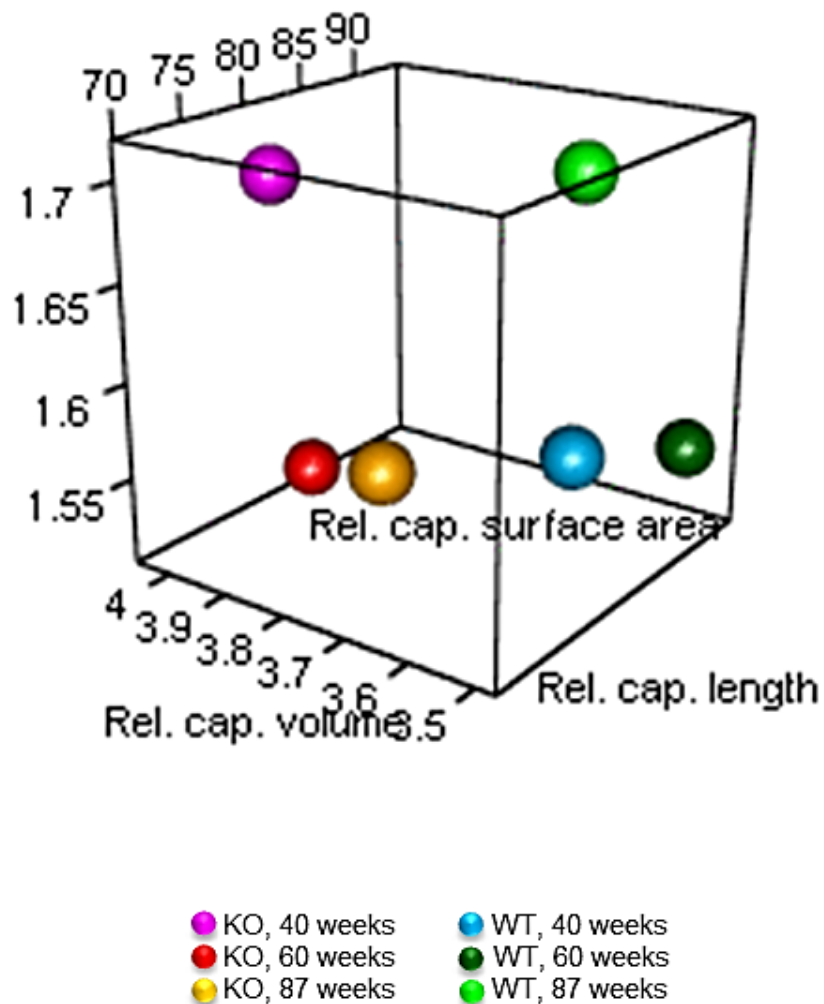


WT, 40 weeks	<span style="color: cyan;">▲</span>	WT, 60 weeks	<span style="color: darkgreen;">◆</span>	WT, 87 weeks	<span style="color: lightgreen;">●</span>
KO, 40 weeks	<span style="color: magenta;">▲</span>	KO, 60 weeks	<span style="color: red;">◆</span>	KO, 87 weeks	<span style="color: orange;">●</span>

**Abb. 62: Dreidimensionale Datenverteilung der arithmetischen Mittelwerte**

Die Darstellung der Datenverteilung der arithmetischen Mittelwerte von KO- (magenta, rot, gelb) und WT-Mäusen (cyan, dunkelgrün, hellgrün) in verschiedenen Altersgruppen (40w Dreieck, 60w Raute, 87w Kreis) zeigte bei den absoluten Kapillarparametern (A) eine Orientierung des Punktwolkenschwerpunktes der WT-Mäuse nach hinten oben links (höhere Werte) und der KO-Mäuse nach vorne unten rechts (niedrigere Werte), während dabei die Punktwolkenschwerpunkte der 60- und 87-Wochen-Gruppen eine höhere Entfernung voneinander aufwiesen als die der 40-Wochen-Gruppen. Für die Darstellung des signifikanten Unterschiedes in den relativen Kapillarparametern (B) musste der Blickwinkel auf den dreidimensionalen Raum gedreht werden (siehe Abb. 63).

## Relative capillary parameters



**Abb. 63: Dreidimensionale Datenverteilung der arithmetischen Mittelwerte der relativen Kapillarparameter - um die vertikale Achse gedreht**

Die Darstellung der Datenverteilung der arithmetischen Mittelwerte von KO- (40w magenta, 60w rot, 87w gelb) und WT-Mäusen (40w cyan, 60w dunkelgrün, 87w hellgrün) in verschiedenen Altersgruppen zeigte bei den relativen Kapillarparametern eine Orientierung des Punktwolkenschwerpunktes der WT-Mäuse in Richtung höhere Werte und der KO-Mäuse in Richtung niedrigere Werte. Für die Darstellung dieses signifikanten Unterschiedes in den relativen Kapillarparametern musste der dreidimensionale Raum um die vertikale Achse gedreht werden, um den Blickwinkel zu verändern.

(Standbild aus Video)

## 5.4 Ergebnisse der Wurfgrößen

Ergänzend zu den Untersuchungen der Steroide, der größeren intratestikularen Gefäße und der Mikrozirkulation (Kapillaren) wurden im Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Durchblutungsstörungen und Infertilität die Daten zur Wurfgröße (Litter size) der Tiere ausgewertet. Dabei wurde jeweils die Anzahl geborener Jungtiere pro Wurf ermittelt. Die Daten wurden in absoluten (Tab. 2 A) sowie auch in prozentualen (Tab. 2 B) Werten für jeden Stamm (WT=blau, KO=rot) dargestellt.

### A absolut

litter.size												
mouse.strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Sum
WT	1	1	4	6	7	2	7	5	4	5	1	43
KO	6	12	17	17	17	15	13	9	2	1	0	109

### B prozentual

litter.size												
mouse.strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Sum
WT	2.3	2.3	9.3	14.0	16.3	4.7	16.3	11.6	9.3	11.6	2.3	100.0
KO	5.5	11.0	15.6	15.6	15.6	13.8	11.9	8.3	1.8	0.9	0.0	100.0

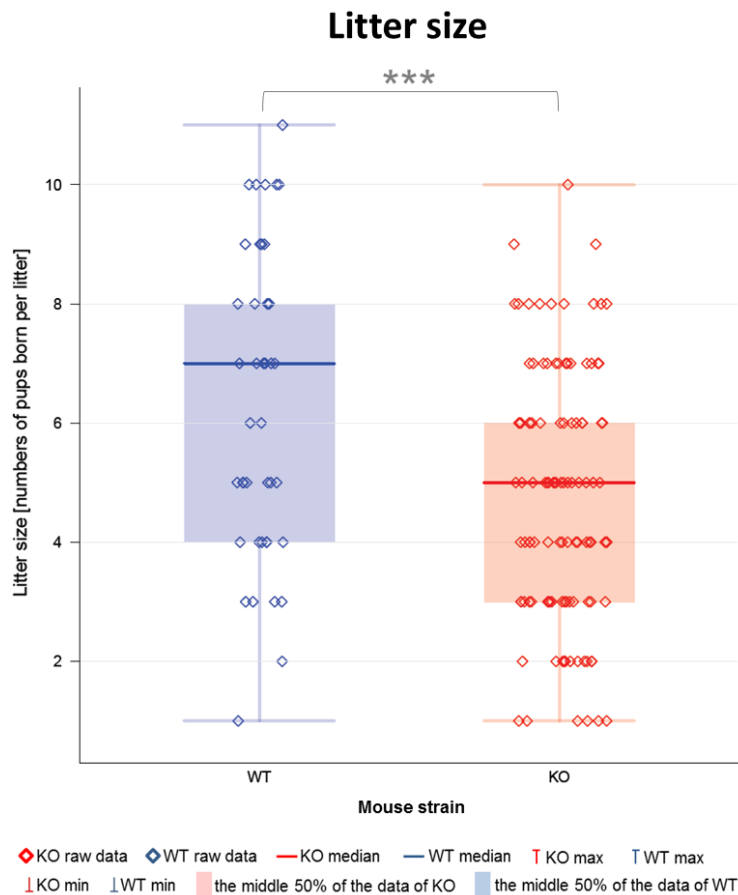
**Tab. 2: Darstellung der Wurfgrößen nach Stamm**

A: Tabellarische Darstellung der Wurfgrößen in absoluten Werten

B: Tabellarische Darstellung der Wurfgrößen in prozentualen Werten

(WT=blau, KO=rot)

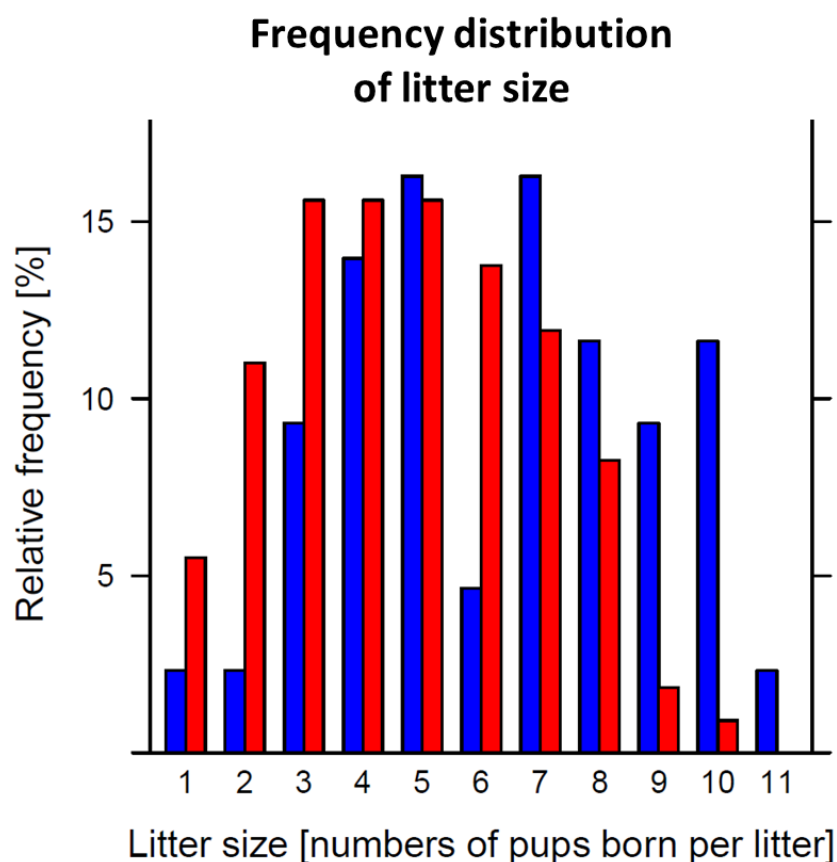
Hierbei wiesen die KO-Mäuse signifikant kleinere Würfe auf, also signifikant weniger Jungtiere pro Wurf, im Vergleich zu den WT-Mäusen ( $***p < 0,001$ ). Dabei lag die durchschnittliche Anzahl von Jungtieren pro Wurf bei den WT-Mäusen bei einem Wert von 6,3256 und bei den KO-Mäusen bei 4,7248 (Abb. 64).



**Abb. 64: Vergleich der Wurfgrößen**

KO-Mäuse (rot) zeigten hochsignifikant reduzierte Wurfgrößen im Vergleich zu WT-Mäusen (blau). ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ )

Zusätzlich zeigte die Häufigkeitsverteilung der Wurfgrößen bei den KO-Mäusen eine stärkere Präsenz bei den kleineren Wurfgrößen als bei den größeren (Abb. 65). Bei den WT-Mäusen ist die Häufigkeit der Wurfgrößen normal verteilt mit stärkerer Präsenz bei den größeren Wurfgrößen als bei den kleinen. Hierbei sind besonders die unterschiedlichen Häufigkeiten von KO- im Vergleich zu WT-Mäusen in den niedrigeren Wurfgrößen von 1-3 Jungtieren pro Wurf und den höheren Wurfgrößen von 8-11 Jungtieren pro Wurf hervorzuheben. Während bei den WT-Mäusen am häufigsten Würfe mit 5 oder 7 Jungtieren pro Wurf vorkamen, lag der Peak bei den KO-Mäusen nach links verschoben bei 3 bis 5 Jungtieren pro Wurf.



**Abb. 65: Vergleich der Häufigkeitsverteilung der Wurfgrößen**

KO-Mäuse (rot) zeigten eine erhöhte Häufigkeitsverteilung bei niedrigen Wurfgrößen und eine erniedrigte Häufigkeitsverteilung bei höheren Wurfgrößen im Vergleich zu WT-Mäusen (blau).



## 6 DISKUSSION

Die vorliegende Studie zeigt auf, dass ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Mäuse im Vergleich zu C57BL6/J-Mäusen, die den Wildtyp darstellen und als Kontrolltiere fungierten, verminderte Serumtestosteronwerte, erhöhte Corticosteronwerte, verminderte Hodenvolumina und Gefäßvolumina, reduzierte absolute kapillare Länge, Volumen und Oberfläche, reduzierte relative Kapillarparameter sowie eine verminderte Wurfgröße aufwiesen.

In der vorliegenden Studie wurden ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Mäuse als Tiermodell verwendet. Generell sind Wildtyp-Mäuse nicht in dem Maße anfällig für arteriosklerotische Veränderungen (*Jawień et al. 2004*) wie der Mensch in Bezug auf die Morphologie und Funktion von Blutgefäßen. ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Mäuse jedoch weisen durch den Gen-Doppelknockout eine ApoE- und LDL-Rezeptor-Defizienz auf, durch die es zur Hypercholesterinämie und nachfolgend zu Gefäßveränderungen (*Plump et al. 1992, Zhang et al. 1992, Ishibashi et al. 1994a, Bonthu et al. 1997, Magoori et al. 2003, Jawień et al. 2004, Langheinrich et al. 2006*) kommt, die typische Charakteristika der humanen Arteriosklerose aufweisen (*Nakashima et al. 1994, Qiao et al. 1994, Reddick et al. 1994, Seo et al. 1997, Langheinrich et al. 2006, 2007a,b, 2010*). Daher stellt diese Mauslinie ein gutes Modell zur Untersuchung arteriosklerotischer Veränderungen dar (*Breslow 1996*).

Diese arteriosklerotischen Veränderungen können durch cholesterin- oder fettreiche Ernährung beschleunigt (*Kostogrys et al. 2012*) und in ihrer Ausprägung intensiviert werden (*Plump et al. 1992, Zhang et al. 1992, Breslow 1996*). In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe (*Langheinrich et al. 2012*) wurden mit Western-Diät gefütterte ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Mäuse mit normal ernährten Kontrolltieren verglichen, um einen größtmöglichen Effekt zu erzielen und untersuchen zu können. In der vorliegenden Studie jedoch erhielten alle Tiere Standarddiät, um die Faktoren, die die Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen begünstigen auf Alter und Deletion von ApoE und LDL-Rezeptoren zu beschränken (*Andesson et al. 2009*). Da bei Normaldiät ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Mäuse mehr atherogene Faktoren aufweisen als ApoE-Singleknockout-Mäuse (*Witting et al. 1999, Jawień et al. 2004*), stellt die Doppelknockout-Maus ein geeignetes Modell zur Untersuchung von Arteriosklerose ohne atherogene Diät dar (*Jawień et al. 2004*).

Für die jetzt durchgeführten Untersuchungen wurden die Mäuse in verschiedene Altersgruppen unterteilt (20, 40, 60 und 87 Wochen), wobei die Gruppe der 87 Wochen alten Mäuse nicht 20 Tiere wie bei den anderen Gruppen beinhaltete, da nur eine geringe

Anzahl der KO-Mäuse das Alter von 87 Wochen erreichte. Diese hohe Sterberate ist für diese Mauslinie bereits beschrieben worden (*Moghadasian et al. 2001, Langheinrich et al. 2006*) – und ist ebenfalls bei Männern bekannt, die an Arteriosklerose leiden (*Bui et al. 2009*). Die Problematik, die sich durch die höhere Letalität für unsere Untersuchungen ergibt, ist die Tatsache, dass vor allem Tiere, die wahrscheinlich am schwersten von Arteriosklerose betroffen waren (im Vergleich zu den Überlebenden) aufgrund ihres früheren Todes nicht in die Studie aufgenommen werden konnten. Das ist aber kein Problem unserer Studie allein, sondern es stellt vielmehr ein kaum beachtetes Phänomen bei den meisten Untersuchungen altersabhängiger Effekte dar.

Wie die vorliegende Studie zeigt, kann Altern an sich ebenfalls Auswirkungen auf den Hoden nehmen, die mit einem Abfall der Androgenwerte und Veränderungen der Hodenmorphologie einhergehen (*Sartorius & Nieschlag 2010*), was wiederum mit strukturellen und funktionellen Störungen von Sertolizellen und Testosteronproduzierenden Leydigzellen assoziiert ist (*Weidner et al. 2002, Sartorius & Nieschlag 2010*). Deutlich stärkere altersabhängige Veränderungen als beim normalen Altern zeigten sich aber bei den untersuchten ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Mäusen der vorliegenden Studie im Vergleich zu ihren gleichaltrigen Wildtypen. Dies war sichtbar in reduzierten Hodenvolumina, wobei der Unterschied zwischen KO- und WT-Maus im höheren Alter deutlich zunahm, genau wie bei den im Serum gemessenen Testosteronwerten, die im Alter absanken und in der höchsten Altersstufe den größten Unterschied zu den Testosteronwerten gleichaltriger Wildtypmäuse besaßen.

In anderen Studien wurden in den Hodentubuli degenerative Veränderungen der Keimzellen und eine Reduzierung des Tubulusepithels bis hin zu fibrotischen Veränderungen beobachtet (*Weidner et al. 2002, Sartorius & Nieschlag 2010*), wobei eine mangelhafte Vaskularisierung in diesem Zusammenhang bereits diskutiert worden ist (*Kühnert & Nieschlag 2004*). In Übereinstimmung damit wiesen die ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Mäuse in der vorliegenden Studie reduzierte Gefäßvolumina auf, die neben größeren Gefäßen auf prä- und postkapillärer Ebene auch die Kapillaren betraf. In einer anderen Untersuchung mit diesen Mäusen sind auch Spermatogenesestörungen erwähnt worden (*Langheinrich et al. 2012*).

Altern verschlimmert arteriosklerotische Veränderungen (*Barac & Panza 2009*), was unter anderem auf den mit ansteigendem Alter zunehmenden oxidativen Stress (*Pansarasa et al. 1999, Dröge 2005*) zurückzuführen ist, der sich begünstigend auf die Entstehung vaskulärer Erkrankungen wie Arteriosklerose auswirkt.

Arteriosklerose ist eine systemische Gefäßerkrankung, deren Auftreten weltweit ansteigt und die eine der häufigsten Todesursachen und Hauptursache für Schlaganfälle und Herzinfarkte in der westlichen Welt darstellt (Ross 1993, Bui et al. 2009, Jaipersad et al. 2014). Dabei entstehen durch inflammatorische Prozesse ausgelöste Ansammlung oxidiert Low-density-Lipoproteine (oxLDL) lipidreiche Plaques in der Arterienwand, was u.a. durch Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus begünstigt wird (Ross 1999, Bui et al. 2009, Runge et al. 2010), ebenso durch „Oxidativen Stress“ ROS (reactive oxygen species), der mit dem Alter ansteigt (Pansarasa et al. 1999, Dröge 2005) und in einer gesteigerten Oxidation von Low-density-Lipoproteinen (oxLDL) und vaskulärer Dysfunktion (Witztum 1994, Zhou et al. 1998) resultiert. Zusätzlich agiert ROS als intrazellulärer Botenstoff, dessen Anstieg proinflammatorische Signalwege bewirkt, die wiederum atherogene Effekte auslösen (Runge et al. 2010). Oxidativer Stress und oxidative Signalwirkung stellen somit eine enge Verbindung zwischen vielen Risikofaktoren für Arteriosklerose dar. In unserer vorangegangenen Studie (Langheinrich et al. 2012) wurde ebenfalls eine Erhöhung von HIF1 alpha, einem Marker für Hypoxie, in alten ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Mäusen festgestellt. Parallel dazu sind in neuesten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe in diesem Zusammenhang Daten erhoben worden, die diese Ergebnisse auf Transkriptionsebene bestätigen.

Um Auswirkungen von Arteriosklerose bzw. systemischen Durchblutungsstörungen und eingeschränkter Hodenperfusion zu erforschen, wurden die Marko- sowie vor allem die Mikrovaskularisation der arteriosklerotischen Hoden der KO-Mäuse analysiert und die Ergebnisse mit denen der gesunden Hoden der Kontrollgruppe (WT-Mäuse) verglichen. Dabei wiesen die KO-Mäuse signifikant reduzierte Werte auf - und zwar in Bezug auf die Makro- und die Mikrovaskularisation. So waren einerseits die Gefäßvolumina der prä- und postkapillären Gefäße in KO-Mäusen reduziert und andererseits nahezu alle Kapillarparameter erniedrigt. Dabei wiesen die KO-Mäuse niedrigere Werte in absoluter Kapillarlänge, -volumen und -oberfläche auf im Gegensatz zu gleichaltrigen WT-Mäusen, wobei sich diese Differenz im höheren Alter noch verstärkte. Auch die relativen Kapillarparameter waren in ihrer Gesamtheit in KO-Mäusen signifikant erniedrigt.

Störungen der Mikrovaskularisation durch arteriosklerotische Veränderungen wurden in anderen Studien mehrmals beschrieben – sowohl im Hinblick auf die Morphologie der Blutgefäße als auch auf inflammatorische Faktoren (Ali et al. 2005, Galkina & Ley 2009, Hansson & Jonasson 2009, Libby 2012), sowie Fetteinlagerungen und -anhäufungen (Salama et al. 2013). In unserer vorangegangenen Studie (Langheinrich et al. 2012) und in neuen Untersuchungen, die neben der Dissertation erhoben wurden, waren Entzündungsmarker und ER-Stress-Marker in KO-Mäusen auf Protein- und

Transkriptionsebene erhöht. Entzündungen und Endothelstörungen können ebenfalls mit mikrovaskulären Prozessen assoziiert sein, die mit Diabetes, Bluthochdruck und anderen Stoffwechselerkrankungen zusammenhängen (*Ikram et al. 2004, Nguyen & Wong 2006*). In diesem Prozess sind Diabetes und metabolisches Syndrom ebenfalls mit Verschluss von Venen (*Wong et al. 2004*) und Arterien (*Nguyen & Wong 2006*) der Netzhaut assoziiert. Darüber hinaus besteht ein Zusammenhang zwischen Fettstoffwechselstörungen, wie erhöhte Cholesterolverwerte (*Ikram et al. 2004*), und Venendilatation. Auch die Architektur der retinalen Netzhautmikrogefäße ist durch diese Änderungen betroffen (*Stanton et al. 1995, Hughes et al. 2006, Nguyen et al. 2007*), deren Ursprung in Diabetes, Bluthochdruck und Übergewicht zu finden ist. Das in der vorliegenden Studie verwendete Tiermodell der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Maus weist durch den oben beschriebenen Gen-Doppelknockout eine ApoE- und LDL-Rezeptor-Defizienz auf, durch die es zur Hypercholesterinämie kommt, was wiederum die besagten Gefäßveränderungen auslöst (*Plump et al. 1992, Zhang et al. 1992, Ishibashi et al. 1994a, Bonthu et al. 1997, Magoori et al. 2003, Jawieñ et al. 2004, Langheinrich et al. 2006*). Des Weiteren wurde in anderen Studien von Abnahme mikrovaskulärer Dichte (*Stanton et al. 1995, Kutschbach et al. 1998, Vicaud 1999, Hughes et al. 2006*) berichtet, vergleichbar mit unseren Erkenntnissen über den arteriosklerotischen Hoden in unserer Studie.

Untersuchungen zu Störungen der Gefäßversorgung in Zusammenhang mit Arteriosklerose bei ApoE- und ApoE/LDL-Rezeptor defizienten Mäusen wurden zuvor in Lunge (*Langheinrich et al. 2004a,b*), Herz (*Ishibashi et al. 1994b, Langheinrich et al. 2004b*), Aorta (*Ishibashi et al. 1994b, Jawieñ et al. 2004, Langheinrich et al. 2006, 2007a,b, Gaudreault et al. 2013, Wang et al. 2014*), Niere (*Langheinrich et al. 2010, Wang et al. 2014*) und Blase (*Bschleipfer et al. 2014*) durchgeführt. Ebenfalls wurde der Zusammenhang zwischen Gefäßversorgung im Hoden und Spermatogenese untersucht und nachfolgende Veränderungen im Hoden aufgezeigt (*Langheinrich et al. 2012*). Die Auswirkungen von Arteriosklerose auf die Mikrovaskularisation auf kapillärer Ebene und ihre tatsächlichen Folgen auf die männliche Fertilität wurden bisher jedoch noch nicht detailliert analysiert. Auch wurden morphologische Gefäßveränderungen innerhalb des Hodens im Falle von allgemeinen Herzkreislauferkrankungen noch nie systematisch untersucht. Dies ist von Interesse, da ein Zusammenhang zwischen koronarer Herzkrankheit und niedrigen Androgenleveln angedeutet wurde (*English et al. 2000*). Detaillierte Beschreibungen regulärer testikulärer Mikrovaskularisation und ihrer Relation zu den Tubuli seminiferi liegen jedoch für verschiedene Spezies vor (*Müller 1957, Hundeiker 1971, Korman & Suoranta 1971*). Früheste Untersuchungen von retinierten

Hoden bei Männern zeigten reduzierte Blutperfusion, die in Atrophie und Hypoplasie des Organs resultierten (*Staemmler 1923*). Darüber hinaus wurde ein Zusammenhang zwischen reduzierter Durchblutung, vermittelt durch reduzierte mikrovaskuläre Lumina im Hoden, als mögliche Ursache für degenerative Veränderungen von Keimzellen und Oligospermie beim Menschen erachtet (*Nasah & Cox 1978*). Zusätzlich wurden mikrovaskuläre Veränderungen in Verbindung mit altersabhängigen Spermatogenesestörungen (*Sasano & Ichijo 1969, Suoranta 1971, Ergün et al. 1994*) und ebenfalls in Zusammenhang mit Leydigzellen (*Ergün et al. 1994*) beschrieben.

In der vorliegenden Studie wurden die Reduzierung des Hodenvolumens und des testikulären Gefäßvolumens der größeren Blutgefäße auf prä- und postkapillärer Ebene bestätigt. Ebenfalls zeigen unsere stereologischen Daten eine Reduzierung absoluter Kapillarlänge. Es ist wahrscheinlich, dass diese Reduktion im interstitiellen Gewebe gleichmäßig verteilt ist, was jedoch nicht in der vorliegenden Studie getestet worden ist. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine reduzierte Kapillarisation in peri- oder intertubulären Bereichen nahe Leydigzellclustern vorherrschen. Seit peritubuläre Kapillaren mit ihrer nahen Lage zu undifferenzierten Spermatogonien als vaskuläre Nische für Keimzellen beschrieben worden sind (*Yoshida et al. 2007*), ist auch eine direkte Auswirkung verminderter Kapillardichte auf die Spermatogenese denkbar. Andererseits könnte der Einfluss auf die Spermatogenese ebenfalls indirekt durch (1) gestörte Leydigzell-Funktion (durch gestörte Blutversorgung), (2) gestörte vaskuläre Verteilung von Testosteron oder (3) reduzierte Anzahl von Leydigzellen (durch gestörte Versorgung oder reduzierte vaskuläre Leydigvorläuferzellen) (*Davidoff et al. 2004*) vermittelt sein. Für die Testosteronversorgung des Hodens könnte das Testosteron über intertubuläre Kapillaren, arterio-venuläre kapilläre Kanäle, intertubuläre Venolen und den Plexus pampiniformis in die Hodenarterie umgeleitet werden (*Murakami et al. 1989*), wodurch man darauf schließen könnte, dass eine geringere Kapillardichte in einer Minderversorgung von Testosteron resultieren könnte, was sich wiederum negativ auf die Spermatogenese auswirken könnte. In der vorliegenden Studie wurden neben reduzierten Kapillarparametern auch erniedrigte Serumtestosteronwerte in KO-Mäusen gemessen, deren Unterschied zu WT-Mäusen in höherem Alter deutlich zunahm.

In der vorliegenden Studie wiesen die KO-Mäuse signifikant reduzierte Kapillarparameter auf. Einflüsse gestörter testikulärer Blutgefäße oder verminderter Durchblutung auf die Spermatogenese wurden bereits angedeutet (*Holstein et al. 1989, Kühnert & Nieschlag 2004*) und die Wichtigkeit von Gewebedurchblutung für eine intakte Spermatogenese zuvor beschrieben (*Herwig et al. 2004*). Verminderte testikuläre Durchblutung wurde dargestellt, um hypoxische Bedingungen zu induzieren, die in Degeneration des

Keimepithels mit gestörter Spermatogenese resultierten (*Liao et al. 2010*). Bezüglich der Morphologie der Hodentubuli wurden degenerative Veränderungen der Keimzellen in Verbindung mit einer Verringerung des Tubulusepithels bis hin zur Fibrose beschrieben, was jedoch nicht in den Hoden aller alter Männer sichtbar ist (*Weidner et al. 2002, Sartorius & Nieschlag 2010*). Mangelhafte Vaskularisierung ist als eine mögliche Ursache in diesem Zusammenhang diskutiert worden (*Kühnert & Nieschlag 2004*). Über das Auftreten fokaler tubulärer Sklerose zusammen mit arteriosklerotischen Läsionen der interstitiellen Hodengefäße ist bereits berichtet worden (*Holstein et al. 1989*). Dabei spielen die Hodenkapillaren eine herausragende Rolle für die normale männliche Fruchtbarkeit. Sie sind wichtig für die Blutversorgung der Hodentubuli, und interessanterweise scheint eine gefäßassoziierte Nische für eine intakte Spermatogenese essentiell zu sein. Wie bereits erwähnt, wurde in Mäusen die direkte Nachbarschaft undifferenzierter Spermatogonien A zu den umliegenden peritubulären Kapillaren festgestellt (*Yoshida et al. 2007*). Demnach kommt den Erkenntnissen über die Reduzierung der gemessenen Kapillarparameter der vorliegenden Studie eine große Bedeutung zu im Hinblick auf ungeklärte männliche Infertilität.

In der vorliegenden Studie konnte Altern als alleiniger Grund für gefäßabhängige Defekte auf die Spermatogenese (*Langheinrich et al. 2012*) in unserem Modell ausgeschlossen werden, da altersabhängige Auswirkungen auf Hormonlevel und Mikrozirkulation in den Wildtyptieren nicht nachgewiesen werden konnten. So zeigten die KO-Mäuse in der vorliegenden Studie signifikant erniedrigte Serumtestosteronwerte im Vergleich zu den WT-Mäusen. Arteriosklerotische Veränderungen wirken sich negativ auf das Serumtestosteron aus (*Jones et al. 2005, Svarthberg et al. 2006*). Androgene wiederum besitzen eine hemmende Wirkung auf Arteriosklerose (*Alexandersen et al. 1996, 1999*), was darauf schließen lässt, dass niedrige Testosteronwerte arteriosklerotische Veränderungen fördern könnten (*Barud et al. 2002*). Zusätzlich induziert ein Rückgang von Testosteron Apoptose von Keimzellen bei der Spermatogenese, wie bei Ratten festgestellt wurde (*Troiano et al. 1994*), was Keimzell-Defekte auch als direkte Folge eines Testosteronmangels erklärbar machen könnte.

Ein direkter Zusammenhang zwischen reduzierten Serumtestosteronleveln und der LDL-Rezeptor-Insuffizienz der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Maus scheint nicht wahrscheinlich, auch wenn niedrige Testosteronwerte bei einem Lipid-Milieu auftreten können, das Arteriosklerose fördert (*Wickramatilake et al. 2013*). Jedoch weisen die KO-Tiere der vorliegenden Studie nahezu physiologische Testosteronwerte in niedrigem Alter auf bei einem ähnlichen Verlauf von AD (5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol), einem Abfallprodukt der Testosteronsynthese.



Zusätzlich sind die Serumlevel von Corticosteron, was wie Testosteron ebenfalls ein Steroidhormon ist und somit auch unter einem möglichen Einfluss eines gestörten Lipid-Milieus stehen würde, in KO-Mäusen signifikant angestiegen.

Dieser Anstieg von Serumcorticosteronleveln könnte durch Stress ausgelöst sein, der durch gestörte Blutzirkulation und mangelhafte Organdurchblutung bei den KO-Mäusen verursacht sein könnte. Hohe Corticosteronwerte wiederum beschleunigen die Ausbildung arteriosklerotischer Veränderungen in ApoE-defizienten Mäusen (*Kumari et al. 2003, Andersson et al. 2009, Okutsu et al. 2014*).

Unsere Befunde über reduzierte Keimzellen und reduzierte Spermienzahl aus der vorliegenden Studie und der vorangegangenen Studie (*Langheinrich et al. 2012*) wurden durch Auswertung der Wurfgrößen bestärkt. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der Jungtiere pro Wurf bei den KO-Mäusen signifikant reduziert war. Dies gibt Hinweise auf einen direkten Zusammenhang zwischen gestörter Blutversorgung und Infertilität, während in anderen Studien gezeigt wurde, dass Altern alleine zwar negative Auswirkungen auf Spermatogenese und Spermienzahl haben kann (*Gosden et al. 1982*), jedoch keinen Einfluss auf die Wurfgröße nimmt (*Finn 1964*). Allerdings kann durch die Auswertung unserer Zuchtdaten nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die reduzierten Wurfgrößen (auch) durch arteriosklerotische Veränderungen in weiblichen KO-Mäusen (*Reddick et al. 1994, Andersson et al. 2009*) mit Einfluss auf die weibliche Fertilität bedingt sein könnten.

All diese Befunde zeigen einen Zusammenhang zwischen arteriosklerotischen Gefäßveränderungen und männlicher Infertilität auf. Im Hinblick auf diese vaskulären Aspekte kann die Ursache sowohl in der Makro- als auch in der Mikrozirkulation liegen. Die Erkenntnisse dieser Studie tragen zum besseren Verständnis der Zusammenhänge von Durchblutungsstörungen und Beeinträchtigung der männlichen Fruchtbarkeit bei und könnten neue Ansätze für die Therapie von Infertilität bei Adipositas, Diabetes und metabolischen Syndrom liefern. In diesem Kontext sind weitere Studien über die Wirkung z.B. von die Gefäßweite beeinflussende PDE-5-Inhibitoren auf Makro- und Mikrovaskularisation des arteriosklerotischen Hodens sinnvoll. Auch sind detaillierte Untersuchungen zur Rolle der Leydigzellfunktion bei den gefundenen Veränderungen hilfreich.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Arteriosklerose ist eine systemische Gefäßerkrankung, deren Auftreten weltweit und mit zunehmendem Alter ansteigt. Bislang fehlen systematische Untersuchungen über einen Zusammenhang zwischen arteriosklerotischen Gefäßveränderungen und männlicher Infertilität. In einer initialen Studie unserer Arbeitsgruppe wurden Spermatogenesestörungen im Arteriosklerosemodell der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Maus (KO) beschrieben. In der vorliegenden Studie sollten die testikulären Gefäße, die Hormonspiegel und die Wurfgrößen der Tiere des KO-Mausmodelles altersabhängig untersucht werden.

Dazu wurden die arteriosklerotischen Hoden von KO-Mäusen im Alter von 20, 40, 60 und 87 Wochen untersucht und mit den gesunden Hoden gleichaltriger C57BL6/J-Mäusen (Wildtyp, WT), die als Kontrolltiere fungierten, verglichen. Hierbei wurden größere testikuläre Gefäße auf prä- und postkapillärer Ebene im MikroCT und die Kapillaren stereologisch analysiert. Parallel dazu wurden Hormonwerte im Serum bestimmt. Zusätzlich wurden die Wurfgrößen der Tiere ausgewertet.

Bei der MikroCT-Untersuchung ließen sich bei den KO-Mäusen altersübergreifend neben reduzierten Hodenvolumina auch reduzierte testikuläre Gefäßvolumina feststellen. Auch in den einzelnen Altersgruppen waren diese Parameter bei den KO-Mäusen im Vergleich zu den jeweils gleichaltrigen Kontrolltieren vermindert. Die stereologische Untersuchung der Mikrozirkulation ergab ebenfalls signifikant reduzierte Werte bei den drei untersuchten Kapillarparametern als Absolutwerte für den ganzen Hoden (Absolutwerte von Kapillarlänge, -volumen und -oberfläche), wobei auch hier in den einzelnen Altersgruppen bei jedem der drei kapillären Parameter die KO-Mäuse reduzierte Werte aufwiesen im Vergleich zu den gleichaltrigen WT-Mäusen. Die in Relation zum jeweiligen Hodenvolumen analysierten Kapillarparameter in ihrer Gesamtheit (Relativwerte von Kapillarlänge, -volumen und -oberfläche) waren bei den KO-Mäusen signifikant vermindert im Vergleich zu den WT-Mäusen. Dies konnte mit einem komplexen statistischen Verfahren (multivariate Varianzanalyse, MANOVA) dokumentiert werden. Parallel dazu zeigten KO-Mäuse reduzierte Serumtestosteronspiegel bei erhöhten Serumcorticosteronspiegeln. Die reduzierte Fertilität der KO-Mäuse konnte durch eine zusätzliche Auswertung der Wurfgrößen bestätigt werden, wobei die KO-Mäuse eine verminderte Anzahl von Jungtieren pro Wurf im Vergleich zu den WT-Mäusen aufwiesen.

Damit liegen eindeutige Ergebnisse vor, die bei diesem Mausmodell mit gestörter Spermatogenese testikuläre Gefäßveränderungen auf allen Ebenen und Hormonstörungen als fertilitätsrelevante Veränderungen anzeigen. Die Erkenntnisse dieser Studie könnten neue die Gefäße beeinflussende Ansätze für die Therapie von Infertilität bei Arteriosklerose liefern.

## 8 SUMMARY

Atherosclerosis is a systemic vascular disease, increasing worldwide and with ageing. So far, no systematic studies showing a correlation between atherosclerotic vascular changes and male infertility were performed. In an initial study from our work group disturbed spermatogenesis in the atherosclerosis-model of ApoE<sup>-/-</sup>/LDL receptor<sup>-/-</sup> double knockout mice (KO) was described. In the present study, testicular vessels, hormone levels and litter size of the animals of the KO mouse model should be investigated age-dependently.

For these studies the atherosclerotic testes of KO mice at the age of 20, 40, 60 and 87 weeks were investigated and compared to the healthy testes of C57BL6/J-mice (wild type, WT) at the same age, the latter serving as control. Testicular vessels at the pre- and postcapillary level were analyzed by MicroCT and the capillaries were analyzed stereologically. In addition hormone levels in serum were determined and litter size of KO mice were compared to wild types.

In the microCT investigation KO mice showed reduced testis volume and reduced testicular vessel volume analyzing all age groups together. In each age group these parameters were also reduced in KO mice compared to age-matched control animals. The stereological study of microvascularization also showed significantly reduced values for the three analyzed capillary parameters (absolute values of capillary length, -volume and -surface area) per testis. In single age groups KO mice exhibited reduced values compared to WT mice of the same age in each of the three capillary parameters. Analyzing all capillary parameters together in relation to the respective testis volume (relative capillary length, -volume and -surface area) significantly reduced values were found in KO compared to WT mice. Moreover KO mice showed decreased serum testosterone levels whereas serum corticosterone levels increased.

Reduced fertility of KO mice was confirmed by analysis of litter size, showing a decreased number of pups per litter in KO mice compared to WT mice.

These results clearly show testicular vascular changes at all levels as well as hormonal imbalances as fertility-related changes in this mouse model with disturbed spermatogenesis. The findings of this study may provide new strategies by use of vasculature-affecting drugs for the therapy of infertility in atherosclerotic patients.

**9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

$\mu\text{A}$	Milliampere
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
A. / Aa.	Arteria / Arterien
Abb.	Abbildung
AD	5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
ApoE	Apolipoprotein E
Aqua dest	destilliertes Wasser
cap.	capillary (kapillar)
CCD	Charge-Coupled Device
DE	Deutschland
EDA	explorative Datenanalyse
ELAM	Endothelium Leukocyte Adhesion Molecules
et al.	et alia (und andere)
FGF	Fibroblast Growth Factor
FSH	follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
h	Stunde(n)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (Puffer)

HFBA	Heptafluorobutyric Anhydrid
Histo	Histologie, histologisch
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
KO	ApoE <sup>-/-</sup> /LDL Rezeptor <sup>-/-</sup> Doppelknockout
kVp	kiloVolt peak (maximal erreichbare Energie der Photonen, Einheit für Röhrenspannung)
LDL	Low Density Lipoprotein
Leydigzellen	Leydig-Zwischenzellen
LH	luteinisierendes Hormon
MANOVA	multivariate analysis of variance (multivariate Varianzanalyse)
Max	Maximum
MCP	Monocyte Chemotactic Protein
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MikroCT	Mikro-Computertomograph, Mikro-Computertomographie
Min	Minimum
min	Minute(n)
MIP	Maximum Intensity Projection
ml	Milliliter
MTF	Modulations Transfer Funktion
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalzlösung)
nm	Nanometer
oxLDL	oxidiertes Low-Density Lipoprotein

p	p-Wert (Signifikanzwert)
PC	Personal Computer
PDE(-Inhibitoren)	Phosphodiesterase(-Hemmer)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PECAM	Platelet-Endothelial-Cell Adhesion Molecules
pH	pH-Wert
rel.	relativ
ROS	reactive oxygene species (oxidativer Stress)
s	Sekunde
SPF	specific pathogen free
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming Grow Factor
V. / Vv.	Vene / Venen
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIS	Visiopharm Integrator System
VRT	Volume-Rendering-Technic
WT	Wildtyp, C57BL6/J



## 10 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

<b>Abb. 1</b>	Der Weg der Samenzellen.....	1
<b>Abb. 2</b>	Anatomischer Aufbau von Hoden und Samenwegen (Schema).....	2
<b>Abb. 3</b>	Anatomischer Aufbau von Hoden und Nebenhoden von Mensch (A) und Maus (B) im Vergleich (Schema).....	3
<b>Abb. 4</b>	Hoden und Nebenhoden der Maus.....	4
<b>Abb. 5</b>	Urogenitales System der männlichen Maus (Schema).....	5
<b>Abb. 6</b>	Urogenitales System der männlichen Maus (in situ).....	6
<b>Abb. 7</b>	Lage des rechten Hodens und Nebenhodens.....	7
<b>Abb. 8</b>	Histologie des Hodenparenchyms.....	8
<b>Abb. 9</b>	Spermatogenesestadien der Maus.....	10
<b>Abb. 10</b>	Tubuluswand und Keimepithel.....	12
<b>Abb. 11</b>	Leydigzellen.....	13
<b>Abb. 12</b>	Verlauf der A. testicularis zum Hoden (Mensch).....	14
<b>Abb. 13</b>	Venenplexus am menschlichen Hoden.....	15
<b>Abb. 14</b>	Venenplexus der einzelnen Arterien im menschlichen Hoden.....	16
<b>Abb. 15</b>	Blutversorgung von Hoden, Nebenhoden und Samenstrang der Maus.....	17
<b>Abb. 16</b>	Blutversorgung des urogenitalen Systems der männlichen Maus.....	18
<b>Abb. 17</b>	Blutversorgung der Reproduktionsorgane der männlichen Maus.....	19
<b>Abb. 18</b>	Aufteilung der kapillaren Gefäßstrecke (Hoden Mensch).....	20
<b>Abb. 19</b>	Räumliche Anordnung des Kapillarnetzes und seiner Beziehung zur Tubuluswand.....	21
<b>Abb. 20</b>	Querschnitt durch das Hodengewebe.....	22
<b>Abb. 21</b>	Querschnitt durch das Hodengewebe (Maus).....	23

<b>Abb. 22</b>	Kapillarnetz innerhalb des Hodengewebes (Ratte).....	24
<b>Abb. 23</b>	Kapillarnetz an der Hodenoberfläche (Ratte).....	25
<b>Abb. 24</b>	Einfluss des oxLDLs auf den Pathomechanismus der Arteriosklerose.....	29
<b>Abb. 25</b>	Pathomechanismen der Arteriosklerose.....	32
<b>Abb. 26</b>	Versuchsaufbau – Kurzbeschreibung des gesamten Ablaufs von der Präparation des Tierkörpers, über die Probenentnahme bis zur Zuordnung des Probenmaterials zu den einzelnen Untersuchungsmethoden.....	38
<b>Abb. 27</b>	Präparation und Probenentnahme: Durchführung.....	49
<b>Abb. 28</b>	Schematische Darstellung des Strahlengangs eines Mikro- Computertomographen.....	52
<b>Abb. 29</b>	3D-Rekonstruktion eines Mikro-CT-Datensatzes von Schnittbildern des Hodens (Volume-Rendering-Technic=VRT).....	53
<b>Abb. 30</b>	Mikrovaskularisation und Hodenparenchym.....	54
<b>Abb. 31</b>	Eponblöckchen aus Gelatinekapseln.....	57
<b>Abb. 32</b>	Zählgitter.....	58
<b>Abb. 33</b>	Unterschied einer Kapillare zu einer Arteriole.....	59
<b>Abb. 34</b>	Prinzip des Testsystems.....	60
<b>Abb. 35</b>	Beispiel für die Auszählung der kapillaren Längendichte mittels Zählrahmen (Counting Frame).....	61
<b>Abb. 36</b>	Zählereignisse im Counting Frame.....	62
<b>Abb. 37</b>	Beispiel für die Auszählung der kapillaren Volumendichte mittels Punktgitter (Point Grid).....	63
<b>Abb. 38</b>	Zählereignisse im Point Grid.....	64
<b>Abb. 39</b>	Beispiel für die Auszählung der kapillaren Oberflächendichte mittels Liniengitter (Line Grid).....	65
<b>Abb. 40</b>	Zählereignisse im Line Grid.....	66

<b>Abb. 41</b>	Vergleich der Testosteronwerte.....	70
<b>Abb. 42</b>	Vergleich der AD-Werte.....	71
<b>Abb. 43</b>	Vergleich der Corticosteronwerte.....	72
<b>Abb. 44</b>	Vergleich der Testosteronwerte im Alter von 20, 40 und 60 Wochen.....	73
<b>Abb. 45</b>	Vergleich der AD-Werte im Alter von 20, 40 und 60 Wochen.....	74
<b>Abb. 46</b>	Vergleich der Corticosteronwerte im Alter von 20, 40 und 60 Wochen.....	75
<b>Abb. 47</b>	Exemplare von MikroCT-Aufnahmen der Hoden.....	76
<b>Abb. 48</b>	Vergleich der Hodenvolumina.....	77
<b>Abb. 49</b>	Vergleich der Hodenvolumina im Alter von 20, 40 und 60 Wochen.....	78
<b>Abb. 50</b>	Vergleich der Gefäßvolumina.....	79
<b>Abb. 51</b>	Vergleich der Gefäßvolumina im Alter von 20, 40 und 60 Wochen.....	80
<b>Abb. 52</b>	Bildausschnitte von Semidünnschnitten der Hoden.....	81
<b>Abb. 53</b>	Vergleich der absoluten Kapillarlänge.....	82
<b>Abb. 54</b>	Vergleich der absoluten Kapillarlänge im Alter von 40, 60 und 87 Wochen.....	83
<b>Abb. 55</b>	Vergleich des absoluten Kapillarvolumens.....	84
<b>Abb. 56</b>	Vergleich des absoluten Kapillarvolumens im Alter von 40, 60 und 87 Wochen.....	85
<b>Abb. 57</b>	Vergleich der absoluten Kapillaroberfläche.....	86
<b>Abb. 58</b>	Vergleich der absoluten Kapillaroberfläche im Alter von 40, 60 und 87 Wochen.....	87
<b>Abb. 59</b>	Vergleich der Gesamtheit aller absoluten Kapillarparameter.....	89
<b>Abb. 60</b>	Vergleich der Gesamtheit aller relativen Kapillarparameter.....	91
<b>Abb. 61</b>	Dreidimensionale Datenverteilung der Rohdaten.....	93
<b>Abb. 62</b>	Dreidimensionale Datenverteilung der arithmetischen Mittelwerte.....	95

<b>Abb. 63</b>	Dreidimensionale Datenverteilung der arithmetischen Mittelwerte der relativen Kapillarparameter – um die vertikale Achse gedreht.....	96
<b>Abb. 64</b>	Vergleich der Wurfgrößen.....	98
<b>Abb. 65</b>	Vergleich der Häufigkeitsverteilung der Wurfgrößen.....	99
<b>Tab. 1</b>	Übersicht Hoden-Einbettung.....	56
<b>Tab. 2</b>	Darstellung der Wurfgrößen nach Stamm.....	97

## 11 LITERATURVERZEICHNIS

Alexandersen P, Haarbo J, Christiansen C (1996): The relationship of natural androgens to coronary heart disease in males: a review. *Atherosclerosis* 125, 1-13.

Alexandersen P, Haarbo J, Byrjalsen I, Lawaetz H, Christiansen C (1999): Natural androgens inhibit male atherosclerosis: A study in castrated, cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* 84, 813-819.

Ali K, Middleton M, Puré E, Rader DJ (2005): Apolipoprotein E suppresses the type I inflammatory response in vivo. *Circ Res* 97, 922-927

Andersson IJ, Jiang YY, Davidge ST (2009): Maternal stress and development of atherosclerosis in the adult apolipoprotein E-deficient mouse offspring. *J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296, R663-R671.

Barac A, Panza JA (2009): Mechanisms of decreased vascular function with aging. *Hypertension* 53, 900-902.

Barud W, Palusiński R, Bełtowski J, Wójcicka G (2002): Inverse relationship between total testosterone and anti-oxidized low density lipoprotein antibody levels in ageing males. *Atherosclerosis* 164, 283-288.

Bonthu S, Heistad DD, Chappell DA, Lamping KG, Faraci FM (1997): Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium – dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 2333-2340.

Breslow JL (1996): Mouse models of atherosclerosis. *Science* 272, 685-688.

Bretz F, Hothorn T, Westfall P (2010): Multiple Comparisons using R. *Chapman, Hall/CRC, Boca Raton/Florida*.

Bschleipfer T, Dannenmaier AK, Illig C, Kreisel M, Gattenlöhner S, Langheinrich AC, Krombach GA, Weidner W, Kampschulte M (2014): Systemic atherosclerosis causes detrusor overactivity – functional and morphological changes in hyperlipoproteinemic apoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> mice. *J Urol*, doi: 10.1016/j.juro.2014.08.098.

Bui QT, Prempeh M, Wilensky RL (2009): Atherosclerotic plaque development. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 2109-2113.

Chubb C, Desjardins C (1982): Vasculature of the mouse, rat and rabbit testis-epididymis. *Am J Anat* 165, 357-372.

Cook MJ (1965): The anatomy of the laboratory mouse. (*Neuaufgabe Academic Press / Elsevier 1965; adapted for the web by Mouse Genome Informatics The Jackson Laboratory, 2005, revised 2008*)  
<http://www.informatics.jax.org/cookbook/imageindex.shtml>

Davidoff MS, Middendorff R, Enikolopov G, Riehtmacher D, Holstein AF, Müller D (2004): Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *J Cell Biol* 167, 935-944.

Donath MY, Dalmás E, Sauter NS, Böni-Schnetzler M (2013): Inflammation in obesity and diabetes: islet dysfunction and therapeutic opportunity. *Cell Metab* 17, 860-872.

Dröge W (2005): Oxidative stress and ageing: is ageing a cysteine deficiency syndrome? *Phil Trans R Soc B* 360, 2355-2372.

Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG (2010): Textbook of Veterinary Anatomy. *Fourth edition, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri.*

Elliot JC, Dover SD (1982): X-ray microtomography. *J Microsc* 126, 211-213.

English KM, Mandour O, Steeds RP, Diver MJ, Jones TH, Channer KS (2000): Men with coronary artery disease have lower levels of androgens than men with normal coronary angiograms. *Eur Heart J* 21, 890-894.

Ergün S, Stingle J, Holstein AF (1994): Microvasculature of the human testis in correlation to Leydig cells and seminiferous tubules. *Andrologia* 26, 255-262.

Finn CA (1964): Influence of the male on litter size in mice. *J Reprod Fertil* 7, 107-111.

- Fox J, Weisberg S (2011): An R Companion to Applied Regression, Second Edition. Thousand Oaks CA: Sage. URL: <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/~jfox/Books/Companion>.
- França LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD (1998): Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol Reprod* 59, 1371-1377.
- Galkina E, Ley K (2009): Immune and inflammatory mechanism of atherosclerosis. *Annu Rev Immunol* 27, 165-197.
- Gaudreault N, Kumar N, Olivas VR, Eberlé D, Stephens K, Raffai RL (2013): Hyperglycemia impairs atherosclerosis regression in mice. *Am J Pathol* 183, 1981-1992.
- Gosden RG, Richardson DW, Brown N, Davidson DW (1982): Structure and gametogenic potential of seminiferous tubules in ageing mice. *J Reprod Fert* 64, 127-133.
- Green E, Coleman DL, Dagg CP, Fuller JL, Green MC, Kaliss N, Russell ES, Staats J (1966): Biology of the laboratory mouse. By the staff of The Jackson Laboratory. (2. Auflage, Dover Publications, INC., New York 1966; adapted for the web by Mouse Genome Informatics The Jackson Laboratory, 2007) <http://www.informatics.jax.org/greenbook/images/13-46.jpg>
- Hansson GK, Jonasson L (2009): The discovery of cellular immunity in the atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 1714-1717.
- Herwig R, Tosun K, Pinggera GM, Soelder E, Moeller KT, Pallwein L, Frauscher F, Bartsch G, Wildt L, Illmensee K (2004): Tissue perfusion essential for spermatogenesis and outcome of testicular sperm extraction (TESE) for assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet* 21, 175-180.
- Hess RA, de França LR (2008): Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. Chapter 1, *Molecular mechanism in spermatogenesis*, edited by C. Yan Cheng, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.
- Holstein AF, Roosen-Runge EC, Schirren C (1989): Illustrated Pathology of Human Spermatogenesis. *Andrologia* 21, p 197, Blackwell Verlag GmbH.



Holstein AF, Schulze W, Davidoff M (2003): Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 107.

Holstein AF (2008): Männliche Geschlechtsorgane. *Kapitel 8.5 aus Anatomie, Benninghoff A und Drenckhahn D, Urban & Fischer Verlag / Elsevier GmbH, 17. Auflage, 799-837.*

Hothorn T, Bretz F, Westfall P (2008): Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal* 50(3), 346-363.

(URL des Paketes: <http://cran.r-project.org/web/packages/multcomp>).

Hughes AD, Martinez-Perez E, Jabbar AS, Hassan A, Witt NW, Mistry PD, Chapman N, Stanton AV, Beevers G, Pedrinelli R, Parker KH, Thom SA (2006): Quantification of topological changes in retinal vascular architecture in essential and malignant hypertension. *J Hypertens* 24, 889-894.

Hundeiker M (1971): Die Capillaren im Hodenparenchym. *Arch klein exp Derm* 239, 426-435.

Ikram MK, de Jong FJ, Vingerling JR, Witteman JCM, Hofman A, Breteler MMB, de Jong PTVM (2004): Are retinal arteriolar or venular diameters associated with markers for cardiovascular disorders? The Rotterdam Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 2129-2134.

Ishibashi Sh, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS (1994a): The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in 'knockout' mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci* 91, 4431-4435.

Ishibashi Sh, Goldstein JL, Brown MS, Herz J, Burns DK (1994b): Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest* 93, 1885-1893.

Jaipersad AS, Lip GY, Silverman S, Shantsila E (2014): The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 63, 1-11.

Jawień J, Nastalek P, Korbut R (2004): Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 55, 503-517.

Jones RD, Nettleship JE, Kapoor D, Jones HT, Channer KS (2005): Testosterone and atherosclerosis in ageing men: purported association and clinical implications. *Am J Cardiovasc Drugs* 5, 141-154.

Jorgensen SM, Demirkaya O, Ritman EL (1998): Three-dimensional imaging of vasculature and parenchyma in intact rodent organs with X-ray micro-CT. *Am J Physiol* 275, H1103-H1114.

Kaplan M, Aviram M (1999): Oxidized Low Density Lipoprotein: atherogenic and proinflammatory characteristics during macrophage foam cell formation. An inhibitory role for nutritional antioxidants and serum paraoxonase. *Clin Chem Lab Med* 37, 777-787.

Kaushik M, Sontineni SP, Hunter C (2010): Cardiovascular disease and androgens: A review. *Int J Cardiol* 142, 8-14.

Kormano M, Suoranta H (1971): Microvascular organization of the adult human testis. *Anat Rec* 170, 31-39.

Kostogrys RB, Franczyk-Żarów M, Maślak E, Gajda M, Mateuszuk Ł, Jackson CL, Chłopicki S (2012): Low carbohydrate, high protein diet promotes atherosclerosis in apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor double knockout mice (apoE/LDL<sup>-/-</sup>). *Atherosclerosis* 223, 327-331.

Kühnert B, Nieschlag E (2004): Reproductive functions of the ageing male. *Hum Reprod Update* 10, 327-339.

Kumari M, Grahame-Clarke C, Shanks N, Marmot M, Lightman S, Vallance P (2003): Chronic stress accelerates atherosclerosis in the lipoprotein E deficient mouse. *Stress* 6, 297-299.

Kutschbach P, Wolf S, Sieveking M, Ittel TH, Schulte K, Reim M (1998): Retinal capillary density in patients with arterial hypertension: 2-year follow-up. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 236, 410-414.

Langheinrich AC, Bohle RM, Breithecker A, Lommel D, Rau WS (2004a): Micro-computed tomography of the vasculature in parenchymal organs and lung alveoli. *Rofo* 176, 1219-1225.

Langheinrich AC, Leithauser B, Greschus S, Von Gerlach S, Breithecker A, Matthias FR, Rau WS, Bohle RM (2004b): Acute rat lung injury: feasibility of assessment with micro-CT. *Radiology* 233, 165-171.

Langheinrich AC, Michniewicz A, Sedding DG, Walker G, Beighley PE, Rau WS, Bohle RM, Ritman EL (2006): Correlation of vasa vasorum neovascularization and plaque progression in aortas of apolipoprotein E (-/-)/low-density lipoprotein (-/-) double knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 347-352.

Langheinrich AC, Michniewicz A, Bohle RM, Ritman EL (2007a): Vasa vasorum neovascularization and lesion distribution among different vascular beds in ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> double knockout mice. *Atherosclerosis* 191, 73-81.

Langheinrich AC, Michniewicz A, Sedding DG, Lai B, Jorgensen SM, Bohle RM, Ritman EL (2007b): Quantitative X-ray imaging of intraplaque hemorrhage in aortas of ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> double knockout mice. *Invest Radiol* 42, 263-273.

Langheinrich AC, Kampschulte M, Scheiter F, Dierkes C, Stieger P, Bohle RM, Weidner W (2010): Atherosclerosis, inflammation and lipoprotein glomerulopathy in kidneys of ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> double knockout mice. *BMC Nephrol* 11, 18.

Langheinrich AC, Paradowska A, Kilinski R, Kampschulte M, Steinfeld K, Altinkilic B, Steger K, Stieger P, Bergmann M, Weidner W (2012): Mixed testicular atrophy related to atherosclerosis: first lessons from the ApoE<sup>-/-</sup>/LDL receptor<sup>-/-</sup> double knockout mouse model. *Int J Androl* 35, 562-571.

Liao W, Cai M, Chen J, Huang J, Liu F, Jiang C, Gao Y (2010): Hypobaric hypoxia causes deleterious effects on spermatogenesis in rats. *Reproduction* 139, 1031-1038.

Libby P, M.D. (2012): History of discovery: inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 2045-2051.

Liu PY, Death AK, Handelsman DJ (2003): Androgens and cardiovascular disease. *Endocr Rev* 24, 313-340.

Magoori K, Kang MJ, Ito MR, Kakuuchi H, Ioka RX, Kamataki A, Kim DH, Asaba H, Iwasaki S, Takei YA, Sasaki M, Usui S, Okazaki M, Takahashi S, Ono M, Nose M, Sakai J, Fujino T, Yamamoto TT (2003): Severe hypercholesterolemia, impaired fat tolerance, and advanced atherosclerosis in mice lacking both low density lipoprotein receptor-related protein 5 and apolipoprotein E. *J Biol Chem* 278, 11331-11336.

Mattfeldt T, Mall G (1987): Growth of capillaries and myocardial cells in the normal rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 19, 1237-1246.

Mattfeldt T, Mall G, Gharehbaghi H, Möller P (1990): Estimation of surface area and length with the orientator. *J Microsc* 159, 301-317.

Mayhew TM (2008): Taking tissue samples from the placenta: an illustration of principles and strategies. *Placenta* 29, 1-14.

Medizinische Hochschule Hannover. [www.mh-hannover.de/kurspraeparate.html](http://www.mh-hannover.de/kurspraeparate.html)

Moghadasian M, McManus BM, Nguyen LB, Shefer S, Nadji M, Godin DV, Green TH, Hill J, Yang Y, Scudamore CH, Frohlich JJ (2001): Pathophysiology of apolipoprotein E deficiency in mice: relevance of apo E-related disorders in humans. *FASEB J* 15, 2623-2630.

Mühlfeld C, Nyengaard JR, Mayhew TM (2010): A review of state-of-the-art stereology for better quantitative 3D morphology in cardiac research. *Cardiovasc Pathol* 19, 65-82.

Mühlfeld C (2014): Quantitative morphology of the vascularization of organs: A stereological approach illustrated using the cardiac circulation. *Ann Anat* 196, 12-19.

Müller I (1957): Kanälchen- und Capillararchitektonik des Rattenhodens. *Z Zellforsch* 45, 522-537.

Mukundan S Jr, Ghaghada KB, Badea CT, Kao CY, Hedlund LW, Provenzale JM, Johnson GA, Chen E, Bellamkonda RV, Annapragada A (2006): A liposomal nanoscale contrast agent for preclinical CT in mice. *AJR Am J Roentgenol* 186, 300-307.

Murakami T, Uno Y, Ohtsuka A, Taguchi T (1989): The blood vascular architecture of the rat testis: a scanning electron microscopic study of corrosion casts followed by light microscopy of tissue sections. *Arch Histol Cytol* 52, 151-172.

Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R (1994): ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14, 133-140.

Nasah BT, Cox JN (1978): Vascular lesions in testes associated with male infertility in Cameroon. Possible relationship to parasitic disease. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 377, 225-236.

Nguyen TT, Wong TY (2006): Retinal vascular manifestations of metabolic disorders. *Trends Endocrinol Metab* 17, 262-268.

Nguyen TT, Wang JJ, Wong TY (2007): Retinal vascular changes in pre-diabetes and prehypertension: new findings and their research and clinical implications. *Diabetes Care* 30, 2708-2715.

Noorafshan A (2014): Stereology as a valuable tool in the toolbox of testicular research. *Ann Anat* 196, 57-66.

Nyengaard JR, Gundersen HJG (1992): The isector: a simple and direct method for generating isotropic, uniform random sections from small specimens. *J Microsc* 165, 427-431.

Okutsu M, Lira VA, Higashida K, Peake J, Higuchi M, Suzuki K (2014): Corticosterone accelerates atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Atherosclerosis* 232, 414-419.

Pansarasa O, Bertorelli L, Vecchiet J, Felzani G, Marzatico F (1999): Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. *Free Rad Biol Med* 27, 617-622.

Perusquía M, Stallone JN (2010): Do androgens play a beneficial role in the regulation of vascular tone? Nongenomic vascular effects of testosterone metabolites. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298, H1301-1307.

Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL (1992): Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in Apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71, 343-353.

Qiao JH, Xie PZ, Fishbein MC, Kreuzer J, Drake TA, Demer LL, Lusis AJ (1994): Pathology of atheromatous lesions in inbred and genetically engineered mice. Genetic determination of arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 14, 1480-1497.

R Core Team (2013): R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*. <http://www.R-project.org/>.

Reddick RL, Zhang SH, Maeda N (1994): Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb* 14, 141-147.

Ritman EL (2004): Micro-computed tomography-current status and developments. *Annu Rev Biomed Eng* 6, 185-208.

Ross R (1993): The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362, 801-809.

Ross R (1999): Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340, 115-126.

Runge MS, Molnar K, Madamanchi NR (2010): “Old” hearts and arteries: the role of oxidative stress. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 121, 52-58.

Russell LD, Ettlin RA, SinhaHikim AP, Clegg ED (1993): Histological and histopathological evaluation of the testis. *Int J Androl* 16, 83.

Salama AF, Kasem SM, Tousson E, Elsisy MKH (2013): Protective role of L-carnitine and vitamin E on the testis of atherosclerotic rats. *Toxicol Ind Health*, doi: 10.1177/0748233712472523.

Sánchez-Guijo A, Hartmann MF, Wudy SA (2013): Introduction to Gas Chromatographie-Mass Spectrometry. In: *Kapitel 3, Hormone assays in biological fluids, Wheeler MJ; Methods in Molecular Biology 1065, pp 27-44, Second edition, Springer Protocols, Humana Press, Springer New York*.

Sarkar D (2008): Lattice: Multivariate Data Visualization with R. *Springer, New York. ISBN 978-0-387-75968-5. <http://lmdvr.r-forge.r-project.org>.*

Sartorius GA, Nieschlag E (2010): Paternal age and reproduction. *Hum Reprod Update* 16, 65-79.

Sasano N, Ichijo S (1969): Vascular patterns of the human testis with special references to its senile changes. *Tohoko J Exp Med* 99, 269-280.

Scherle W (1970): A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie* 26, 57-60.

Schwarcz MD, Frishman WH (2010): Testosterone and coronary artery disease. *Cardiol Rev* 18, 251-257.

Seo HS, Lombardi DM, Polinsky P, Powell-Braxton L, Bunting S, Schwartz SM, Rosenfeld ME (1997): Peripheral vascular stenosis in apolipoprotein E-deficient mice. Potential roles of lipid deposition, medial atrophy and adventitial inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 3593-3601.

Staemmler M (1923): Über Arterienveränderungen im retinierten Hoden. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 245, 304-321.

Stanton AV, Wasan B, Cerutti A, Ford S, Marsh R, Sever PP, Thom SA, Hughes AD (1995): Vascular network changes in the retina with age and hypertension. *J Hypertens* 13, 1724-1728.

Stringer BM, Wynford-Thomas D, Williams ED (1982): Physical randomization of tissue architecture: an alternative to systemic sampling. *J Microsc* 126, 179-182.

Suoranta H (1971): Changes in the small blood vessels of the adult human testis in relation to age and to some pathological conditions. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat* 352, 165-181.

Suzuki F (1982): Microvasculature of the mouse testis and excurrent duct system. *Am J Anat* 163, 309-325.



Svartberg J, von Muhlen D, Mathiesen E, Joakimsen O, Bonna KH, Stensland-Bugge E (2006): Low testosterone levels are associated with carotid atherosclerosis in men. *J Intern Med* 259, 576-582.

Troiano L, Fustini MF, Lovato E, Frasoldati A, Malorni W, Capri M, Grassilli E, Marrama P, Franceschi C (1994): Apoptosis and spermatogenesis: evidence from an in vivo model of testosterone withdrawal in the adult rat. *Biochem Biophys Res Commun* 202, 1315-1321.

VandenHeuvel WJA, Horning EC (1960): Gas chromatography of adrenal cortical steroid hormones. *Biochem Biophys Res Commun* 3, 356-360.

Van Vré EA, van Beusekom HM, Vrints CJ, Bosmans JM, Bult H, Van der Giessen WJ (2007): Stereology: a simplified and more time-efficient method than planimetry for the quantitative analysis of vascular structures in different models of intimal thickening. *Cardiovasc Pathol* 16, 43-50.

Vicaut E (1999): Microcirculation and arterial hypertension. *Drugs* 59, Spec No: 1-10.

Villar VC, Mandarim-de-Lacerda CA (1995): Myocardial microvasculature in fetuses and neonates of rat. Stereological study. *Ital J Anat Embryol* 100, 211-218.

Waites GMH, Moule GR (1967): Relation of vascular heat exchange to temperature regulation in the testis of the ram. *J Reprod Fertil* 2, 213-224.

Wan SY, Ritman EL, Higgins WE (2002): Multi-generational analysis and visualization of the vascular tree in 3D micro-CT images. *Comput Biol Med* 32, 55-71.

Wang Y, Lu H, Huang Z, Lin H, Lei Z, Chen X, Tang M, Gao F, Dong M, Li R, Lin L (2014): Apolipoprotein E-knockout mice on high-fat diet show autoimmune injury on kidney and aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 450, 788-793.

Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF (1966): Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol* 30, 23-38.

Weidner W, Diemer Th, Bergmann M (2002): Infertility in the ageing male. In: *Kapitel 12, Textbook of Men's Health and Aging* (eds B Lunenfeld, M Gooren), 2. Auflage, pp 97-103. Parthenon BocaRaton, London, New York.

Wickramatilake CM, Mohideen MR, Pathirana C (2013): Association of serum testosterone with lipid abnormalities in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Indian J Endocrinol Metab* 17, 1061-1065.

Wiest G, Gharehbaghi H, Amann K, Simon T, Mattfeldt T, Mall G (1992): Physiological growth of arteries in the rat heart parallels the growth of capillaries, but not of myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 24, 1423-1431.

Witting PK, Pettersson K, Östlund-Lindqvist AM, Westerlund C, Eriksson AW, Stocker R (1999): Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene double knockout mice. *FASEB J* 13, 667-675.

Witztum JL (1994): The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 344, 793-795.

Wong TY, Duncan BB, Golden SH, Klein R, Couper DJ, Klein BEK, Hubbard LD, Sharrett AR, Schmidt MI (2004): Associations between the metabolic syndrome and retinal microvascular signs: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 2949-2954.

Wu FCW, von Eckardstein A (2003): Androgens and coronary artery disease. *Endocr Rev* 24, 183-217.

Wudy SA, Hartmann M, Homoki J (2002): Determination of 11-deoxycortisol (Reichstein's compound S) in human plasma by clinical isotope dilution mass spectrometry using benchtop gas chromatography-mass selective detection. *Steroids* 67, 851-857.

Yoshida Sh, Sukeno M, Nabeshima YJ (2007): A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science* 317, 1722-1726.

Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N (1992): Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258, 468-471.

Zhou X, Paulsson G, Stemme S, Hansson GK (1998): Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apoE-knockout mice. *Invest* 101, 1717-1725.

## 12 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

ApoE<sup>-/-</sup>/LDL receptor<sup>-/-</sup> double knockout mice show changes of testicular macro- and microvascularization, hormone levels and litter size.

Steinfeld K\*, Middendorff R\*, Mühlfeld C, Kampschulte M, Mietens A, Krombach GA, Wudy S, Hartmann M, Altinkilic B, Eichner G, Linn T, Weidner W  
(2015, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, in Vorbereitung)

*\*The first two authors contributed equally to this work*

Atherosclerosis-associated mixed testicular atrophy: novel hormonal and microvascular aspects in ApoE<sup>-/-</sup>/LDL receptor<sup>-/-</sup> double knockout mouse model.

Steinfeld K, Middendorff R, Kampschulte M, Mietens A, Langheinrich AC, Krombach G, Linn T, Mühlfeld C, Wudy S, Hartmann M, Paradowska-Dogan A, Altinkilic B, Bergmann M, Weidner W

(29<sup>th</sup> Annual Congress of European Association of Urology (EAU) 11.-15.04.2014 in Stockholm; **Best Poster** in Poster Session 13: "Male Infertility: Basic to clinical")

Atherosclerosis-associated mixed testicular atrophy: novel hormonal and microvascular aspects in ApoE<sup>-/-</sup>/LDL receptor<sup>-/-</sup> double knockout mouse model.

Steinfeld K, Middendorff R, Kampschulte M, Mietens A, Langheinrich AC, Krombach G, Linn T, Mühlfeld C, Wudy S, Hartmann M, Paradowska-Dogan A, Altinkilic B, Bergmann M, Weidner W

(Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung (DGAF) 13.-15.03.2014 in Rauischholzhausen)

Mixed testicular atrophy is related to atherosclerosis in the ApoE<sup>-/-</sup>/LDL receptor<sup>-/-</sup> double knockout mouse model: New data of the arterial supply of the tubules.

Steinfeld K, Middendorff R, Kampschulte M, Mietens A, Langheinrich AC, Krombach G, Linn T, Mühlfeld C, Wudy S, Hartmann M, Pilatz A, Paradowska-Dogan A, Altinkilic B, Bergmann M, Weidner W

(AUF-Symposium "Urologische Forschung der DGU" 14.-16.11.2013 in Gießen)

Mixed testicular atrophy is related to atherosclerosis in the ApoE<sup>-/-</sup>/LDL receptor<sup>-/-</sup> double knockout mouse model: New data of the arterial supply of tubules.

Steinfeld K, Middendorff R, Kampschulte M, Langheinrich AC, Linn T, Paradowska-Dogan A, Altinkilic B, Bergmann M, Mühlfeld C, Krombach G, Weidner W

(67. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V. (DGU) 25.-28.09.2013 in Dresden; **2. Posterpreis der DGU**)

Mixed testicular atrophy related to atherosclerosis: further lessons from the ApoE<sup>-/-</sup>/LDL receptor<sup>-/-</sup> double knockout mouse model.

Steinfeld K, Middendorff R, Kampschulte M, Langheinrich AC, Krombach G, Linn T, Pilatz A, Paradowska-Dogan A, Altinkilic B, Bergmann M, Mühlfeld C, Weidner W

(International Congress of Andrology (ICA) 23.-26.02.2013 in Melbourne)

Morphometry of murine testicular vascularization: a micro-CT study.

Steinfeld K, Kampschulte M, Krombach G, Weidner W

(International Congress of Andrology (ICA) 23.-26.02.2013 in Melbourne)

Mixed testicular atrophy related to atherosclerosis: further lessons from the ApoE<sup>-/-</sup>/LDL receptor<sup>-/-</sup> double knockout mouse model.

Steinfeld K, Middendorff R, Kampschulte M, Langheinrich AC, Krombach GA, Linn T, Mühlfeld C, Pilatz A, Paradowska-Dogan A, Altinkilic B, Bergmann M, Weidner W

(7<sup>th</sup> European Congress of Andrology (ECA) 28.11.-01.12.2012 in Berlin;

**1. Posterpreis**)

Mixed testicular atrophy related to atherosclerosis: first lessons from the ApoE<sup>-/-</sup>/LDL receptor<sup>-/-</sup> double knockout mouse model.

Langheinrich AC, Paradowska A, Kilinski R, Kampschulte M, Steinfeld K, Altinkilic B, Steger K, Stieger P, Bergmann M, Weidner W

(2012, Int J Androl 35, 562-571)

**13 ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION****Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt.

Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt.

***Kai Steinfeld***

## 14 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die mich durch die Zeit des Studiums und der Promotion begleitet haben und an der Fertigstellung dieser Arbeit beteiligt waren.

- Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Doktorvätern, Herrn Prof. Dr. Wolfgang Weidner, Herrn Prof. Dr. Ralf Middendorff und Herrn Prof. Dr. Martin Bergmann, für die Überlassung dieses interessanten Themas und die tatkräftige Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich hier Herrn Prof. Dr. Ralf Middendorff für die ausgezeichnete Betreuung und seine unermüdliche Geduld mit mir in allen Bereichen meiner Promotion danken!

- Herrn Dr. Marian Kampschulte danke ich für die tolle Einarbeitung und Betreuung bei der Durchführung der Tierkörperperfusionen, für das geduldige Erklären der MikroCT-Technik und die aufbauenden Worte beim Schreiben des Papers.
- Meinen herzlichen Dank geht auch an Frau Gunhild Martels für die Anfertigung der MikroCT-Datensätze, die Einarbeitung in die Bildanalyse-Software und die netten Schwätzchen zwischendurch auf dem Flur.
- Herrn Prof. Dr. Christian Mühlfeld danke ich für die gute Einführung in die Stereologie und Hilfestellungen sowohl bei der Herstellung der Präparate als auch bei der Arbeit am Mikroskop.
- Ebenfalls für die Hilfe am Mikroskop möchte ich Frau Dr. Wiebke Dallmann danken.
- Herzlichen Dank an Herrn Gerhard Kripp und Herrn Gerd Magdowski für die tatkräftige Unterstützung bei der Herstellung der Gewebeschnitte.

- Herrn Prof. Dr. Stefan Wudy, Frau Dr. Michaela Hartmann, Frau Maike Schäfer und Herrn Dr. Bora Altinkilic möchte ich herzlich für die Bearbeitung der Blutproben und die Hilfestellung für die Auswertung der Steroidprofile danken.
- Meinen besonderen Dank gilt Herrn Dr. Gerrit Eichner und Frau Dr. Andrea Mietens für die gute Zusammenarbeit bei der statistischen Analyse meiner gesammelten Daten, für die kompetente Beratung, Ausdauer und Hilfsbereitschaft.
- Danken möchte ich auch Herrn Dr. Daniel Zahner für seine gute Beratung und Unterstützung in allen Tierhaltungs- und Tierschutzfragen, außerdem den Tierpflegern Herrn Ernst Balser, Frau Christine Stellwagen und Herrn Ingo Lotz für die gute Betreuung der Mäuse und die unkomplizierte Abwicklung bei der Bereitstellung der Tiere und der OP-Räume.
- Weiter möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Molekulare Andrologie sowie der AG Middendorff herzlichen für die nette Atmosphäre im Labor und die lustigen Betriebsausflüge und Weihnachtsfeiern bedanken – Mädels, es war toll mit Euch!!!
- Meinen herzlichsten Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern für den Rückhalt und die Motivation in dieser Zeit. Dabei möchte ich ganz besonders meiner Tante und meinem Onkel, Ursel und Hartmut Steinfeld, danken für die finanzielle und mentale Unterstützung während des Studiums, ohne die eine Promotion nicht möglich gewesen wäre.
- Last but not least - meinen besonderen Dank schulde ich den vielen Mäusen, die für die vorliegende Arbeit ihr Leben lassen mussten.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6367-2



9 78 3 835 19 63 6 7 2